POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

postępy biochemii

PL ISSN 0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 46, NR 2, 2000 . . . . . .

6 kwietnia br. obiegła świat sensacyjna wiadomość o odczytaniu przez firmę Celera całkowitej sekwencji genomu człowieka. Nie oznacza to wcale, że zakończony został największy i najambitniejszy program badawczy w historii biologii i medycyny. Osiągnięto jednak ważny etap na drodze do całkowitego poznania informacji, według której funkcjonuje ludzki organizm.

Gdyby zapis zawarty w genomie człowieka porównać do treści książki, to na tym etapie Celera poznała już poszczególne słowa (wszystkie drobne elementy „pociętej" na fragmenty sekwencji). Dopiero ułożenie tych słów, zgodnie z oryginałem, w zdania (geny), akapity (grupy sprzężonych sekwencji) i rozdziały (poszczególne chromosomy), nada tej informacji sens. Na to trzeba jeszcze poczekać, według różnych szacunków od kilku miesięcy do trzech lat. Jak obliczono, zapisanie całej sekwencji ludzkiego genomu zajęłoby około 500 tysięcy stron drobnego druku. Gdy Celera zakończy etap składania fragmentów sekwencji w całość, najprawdopodobniej pozostaną tysiące pustych kartek (przerw w ciągłości sekwencji). Wynikiem systematycznego podejścia międzynarodowego Projektu Badawczego — Genom Człowieka (HGP – *Human Genome Project*), z którym rywalizuje firma Celera, ma być księga ludzkiego genomu, ze znacznie mniejszą liczbą nie zapisanych stron.

W realizację HGP, rozwijanego od 10 lat zaangażowanych jest około 1100 badaczy z kilkunastu ośrodków w 6 państwach. Dotychczasowe nakłady na ten projekt w USA wynoszą około 2,5 mld USD, w tym 250 mln USD to koszty samego etapu sekwencjonowania. Sekwencja genomu człowieka, w wydaniu HGP, ma być mozaiką sekwencji genomów 10 ludzi.

Potencjał firmy Celera, powstałej niespełna 2 lata temu, której siedziba mieści się w Rockville, Maryland w USA, to ponad 500 badaczy i 300 mln USD zainwestowanych w sekwencjonowanie genomów. Badania prowadzone na skalę „przemysłową", cechuje odwaga w podejmowaniu ryzyka. Motto firmy brzmi „Odkrycie nie może czekać". Na sekwencję ludzkiego genomu mają się złożyć całkowite sekwencje genomów 5 ludzi, mężczyzn i kobiet, o różnym pochodzeniu etnicznym.

Gracjan Michlewski, Włodzimierz Krzyżosiak

Od Redakcji

Z przyjemnością informujemy, że 6 kwietnia b. r. wpłynął do naszej Redakcji artykuł p.t. „Sekwencjonowanie genomu człowieka – dwa projekty badawcze, dwie strategie" autorstwa kol. Gracjana Michlewskiego i kol. Włodzimierza Krzyżosiaka.

Tekst artykułu publikujemy na stronie 187

Zofia Zielińska
17 kwietnia 2000

Kwartalnik "Postępy Biochemii" wydawany z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych
Indeksowany w Medline, Agrolibrex i MediClub

postępy biochemii

WYDAWCA
Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa, Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl
www.ptbioch.edu.pl

ADRES REDAKCJI
Address
REDAKCJA KWARTALNIKA „POSTĘPY BIOCHEMII"
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

Kwartalnik "Postępy Biochemii" wydawany z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych
Indeksowany w Medline, Agrolibrex i MediClub

SPIS TREŚCI

CONTENTS

ARTYKUŁY

Priony u drożdży i grzybów nitkowatych

Priony in yeast and filamentous fungi

MAGDALENA BOGUTA*

Spis treści:

Contents

Wykaz stosowanych skrótów: PrP^{Sc} — prion ssaczy, zakaźna forma białka PrP wywołująca pasażowalne amyloidozy mózgowe; PrP^{C} — białko komórkowe PrP, forma nie zakaźna; Ure2 — represor katabolizmu związków azotu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*; [URE] — prion drożdżowy, zagregowana forma białka Ure2, jednocześnie oznaczenie mutantów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w których ten prion występuje; Sup35 — czynniki terminacji translacji (eRF3) drożdży *Saccharomyces cerevisiae*; [PSI] — prion drożdżowy, zagregowana forma białka Sup35, jednocześnie oznaczenie mutantów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w których ten prion występuje; *het-s*, *het-S* — różne allele genu kodującego białko odpowiedzialne za krzyżowanie się szczepów grzyba nitkowatego *Podospora anserina*; [het-s], [het-s*] — cechy fenotypowe *Podospora anserina* związane ze zdolnością do krzyżowania, przy czym [het-s] oznacza prion odpowiedzialny za tworzenie bariery uniemożliwiającej określone krzyżówki

I. Wstęp

Prion jest to białko o szczególnej, „zaraźliwej" konformacji, która jest przekazywana cząsteczkom tego samego białka o konformacji normalnej. Przemiana do konformacji prionu prowadzi do agregacji i utraty aktywności białka. Agregaty prionów mają postać włókien amyloidowych o charakterystycznym obrazie mikroskopowym.

Termin „prion" został pierwotnie wprowadzony w celu określenia infekcyjnego czynnika PrP^{Sc} wywołującego śmiertelne choroby mózgowe ssaków. Choroby wywoływane przez prion to pasażowalne amyloidozy, między innymi ludzka choroba Creutzfelda-Jacoba, choroba wściekłych krów i choroba *scrapie* u owiec.

Zgodnie z hipotezą P r u s i n e r a, przemiana konformacji prowadząca do powstania prionu zachodzi bez udziału kwasu nukleinowego. Białko komórkowe PrP^{C}, kodowane przez gen *PrP* gospodarza, samorzutnie ulega konwersji do konformacji prionu, PrP^{Sc}. Konwersja może zachodzić spontanicznie lub może być wywołana poprzez wprowadzenie cząsteczki prionu, który powoduje lawinową reakcję zmiany konformacji całej puli komórkowego białka PrP^{C} do formy PrP^{Sc}. Efektem końcowym jest powstawanie agregatów amyloidowych i śmierć komórki [1].

Zdarza się, że szczególnie interesujące teorie naukowe rodzą się poprzez skojarzenie zjawisk, które pozornie nie wiążą się zupełnie ze sobą. Tak właśnie powstała teoria prionów drożdżowych sformułowana przez W i c k n e r a w 1994 roku [2]. W i c k n e r połączył niestandardowe cechy cytoplazmatycznych

*Doc. dr hab, Zakład Genetyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel. 659 7072 w. 1312, email: magda@ibbrain.ibb.waw.pl

czynników [PSI] i [URE] u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z cechami prionu, wyjaśniającymi mechanizm infekcji wywołujący śmiertelne choroby mózgowe u ssaków. Skojarzenie to pozwoliło na zrozumienie kłopotliwych w interpretacji wyników genetycznych i niezrozumiałych obserwacji dotyczących czynników [PSI] i [URE], nagromadzonych w ciągu blisko 30 lat. Hipoteza Wicknera została poparta serią pomysłowych doświadczeń genetycznych, a następnie ugruntowana poprzez badania z zakresu biologii molekularnej, biochemii i obserwacje mikroskopowe.

Ostatnio na podstawie analogicznych kryteriów genetycznych zdefiniowano jako kolejny prion czynnik [Het-s], przenoszony przez cytoplazmę grzyba nitkowatego *Podospora anserina* [3].

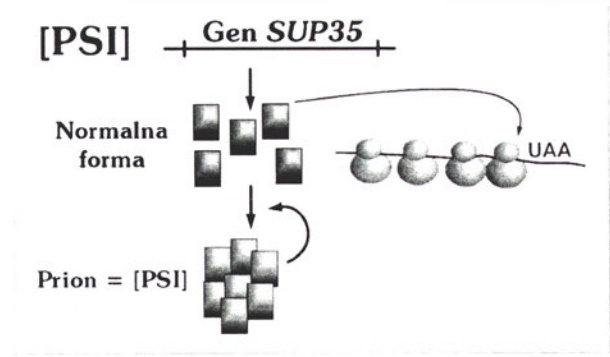
II. Priony u drożdży i grzybów nitkowatych

W przeciwieństwie do PrP, priony występujące u grzybów nie powodują śmierci komórki. Priony drożdży są czynnikami dziedzicznymi, które modyfikują podstawowe procesy metaboliczne. Prion [het-s] *Podospora* pełni określoną funkcję fizjologiczną. Podobnie jak w przypadku prionów ssaczych, fenotyp prionów [PSI], [URE] i [het-s] nie wynika ze zmiany na poziomie kwasu nukleinowego, lecz na poziomie konformacji białka. A więc, w obu przypadkach czynnikiem determinującym pewną cechę dziedziczną jest nie DNA lecz szczególna struktura białkowa.

Czynnik [PSI] u drożdży, odkryty przez Coxa w 1965 roku, powoduje słabą supresję kodonów stop w mRNA [4]. W wyniku badań prowadzonych w ostatnich latach wykazano, że [PSI] jest konformacją prionową czynnika terminacji translacji, białka Sup35 [5].

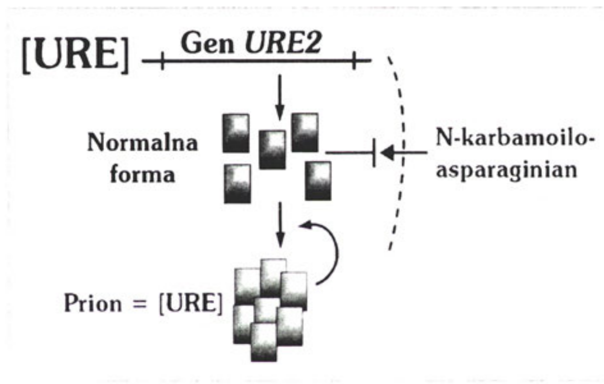
Aktywna terminacja zachodzi wtedy, gdy białko Sup35 występuje w formie rozpuszczalnej. Występowanie Sup35 w formie zagregowanej jako prion [PSI] powoduje defekt w terminacji i supresję kodonów stop (Ryc. 1).

Czynnik [URE], opisany został w 1971 roku przez Lacrouta [6] powoduje brak represji enzymów katabolizmu zwiazków azotu. Jak wykazano na podstawie współcześnie prowadzonych badań, prion [URE] jest formą białka Ure2 [2]. Białko Ure2 jest z kolei represorem Gln3, czynnika transkrypcyjnego aktywującego geny związane z metabolizmem azotu. Na pożywce pełnej, przy dostępności związków będących dobrymi źródłami azotu, jak amoniak, białko Ure2 blokuje ekspresję genów zaangażowanych w katabolizm gorszych źródeł azotu. Natomiast



Ryc. 1. Prion [PSI]: interpretacja fizjologiczna. Zagregowane białko Sup35 (prion [PSI]) umożliwia translację mimo kodonu nonsens w mRNA. Aktywne białko Sup35 jest czynnikiem terminacji translacji u drożdży.

prion [URE] stanowi nieaktywną, zagregowaną formę białka Ure2, która umożliwia wykorzystanie gorszych źródeł azotu w obecności amoniaku. Cecha ta stanowiła podstawę pozytywnej selekcji mutantów [URE] (Ryc. 2).



Ryc. 2. Prion [URE]: interpretacja fizjologiczna. Zagregowana forma białka Ure2 (prion [URE]) umożliwia pobieranie N-karbamoiloasparaginianu (związku będącego gorszym źródłem azotu) w obecności amoniaku. Aktywne białko Ure2 jest represorem tego procesu u drożdży.

Fenotyp [het-s] został opisany przez Rizeta w 1952 roku jako cecha związana z tworzeniem tzw. bariery międzyszczepowej u *Podospora anserina* [7].

Efektywna krzyżówka dwóch szczepów *Podospora* jest możliwa tylko wtedy, gdy ściśle określone geny, nazwane genami *het*, mają identyczną sekwencję w obu szczepach. W przeciwnym wypadku wzajemne przenikanie się grzybni nie jest możliwe ze względu na tworzenie bariery. Jeden z genów *het* występuje w postaci dwóch alleli, *het-s* i *het-S*. Krzy-żówki *het-s* x *het-s* oraz *het-S* x *het-S* zachodzą efektywnie, dając odpowiednio potomstwo *het-s* i *het-S*, podczas gdy w potomstwie krzyżówki *het-s* x *het-S*

pojawiają się fenotypy [het-s] i [het-s*], gdzie [het-s] oznacza prion, zaś [het-s*] — jego brak. Właśnie prion [het-s] tworzy aktywną barierę w krzyżówce ze szczepem *het-S*, podczas gdy szczepy o fenotypie [het-s*] nie mają ograniczenia w krzyżowaniu z *het-s* i *het-S* [3]. Podczas gdy fenotypy [PSI] i [URE] wiążą się z brakiem aktywności Sup35 i Ure2, detekcja [het-s] odbywa się na podstawie jego pozytywnej aktywności w kontroli fuzji dwóch grzybni [3].

III. Cechy genetyczne prionów

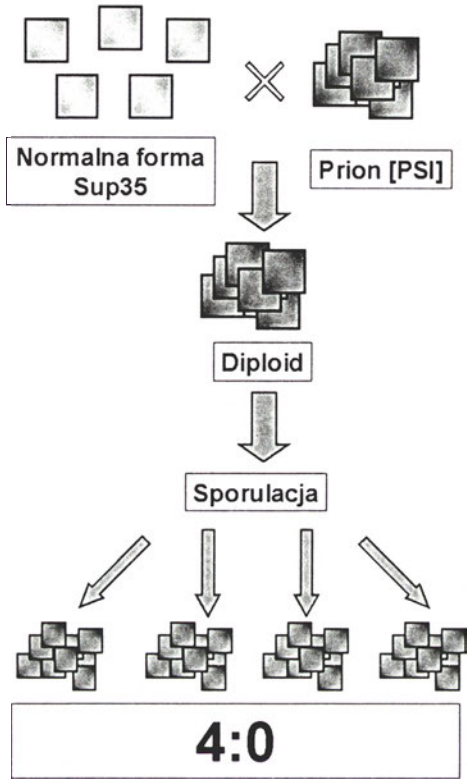
Cechy genetyczne prionów opisano już szereg lat temu, ale dopiero obecnie ich interpretacja stała się możliwa.

[PSI], [URE] i [het-s] dziedziczą się w sposób dominujący, gdyż cała pula białka komórkowego w powstającym diploidzie przechodzi w konformację prionu. Prion dziedziczy się w całym potomstwie mejotycznym (4:0). Taki sposób dziedziczenia, niezgodny z prawami Mendla, byłby łatwy do wytłumaczenia w przypadku cech przenoszonych przez mt-DNA, plazmidy bądź wirusy, lecz [PSI], podobnie jak [URE] i [het-s], nie wiąże się ze zmianami w pozachromosomalnym DNA czy RNA. Chodzi wyłącznie o konformację białka, która przenosi się przez cytoplazmę do komórek potomnych [8].

Stwierdzono, że cechy [PSI] i [URE] zanikają jeśli komórki są traktowane chlorowodorkiem guanidyny dodanym do pożywki. Chlorowodorek guanidyny jest czynnikiem denaturującym białka. Pod jego wpływem konformacja prionu przechodzi w konformację aktywnego białka. Prion [het-s] nie jest wrażliwy na działanie chlorowodorku guanidyny lecz ulega neutralizacji pod wpływem szoku osmotycznego. Po usunięciu czynnika inaktywującego, w komórkach potomnych po kilku generacjach zaczynają się pojawiać z niewielką częstością cechy fenotypowe prionu. Jest to kolejna obserwacja, która nie może być wytłumaczona zmianami w DNA [8] (Ryc. 3).

Znane są punktowe mutacje recesywne w genach *SUP35* i *URE2*, które wykazują regularną segregację mejotyczną 2:2. Fenotyp mutacji recesywnych przypomina fenotypy [PSI] i [URE], gdyż mutacje powodują brak aktywnych białek. Metodami genetyki klasycznej wykazano, że w chromosomalnych mutantach *sup35* i *ure2* cechy [PSI] i [URE] są eliminiwane. Teoria prionów drożdżowych stanowi logiczną interpretację tej obserwacji. Do propagacji cech [PSI] i [URE] konieczna jest normalna forma białek Sup35 i Ure2, gdyż one stanowią „matrycę" do produkcji prionu. Istnienie normalnej formy tych białek zapewniają jedynie dzikie, nie zmutowane geny *SUP35* i *URE2* [9, 10].

Jest regułą, że częstość indukcji prionu wzrasta jeśli spowodować nadprodukcję białka-matrycy. Nadekspresja genów *SUP35* i *URE2* jak również allelu *het-s* powoduje odpowiednio wzrost częstości występowania kolonii [PSI], [URE] i [het-s] [3, 8].

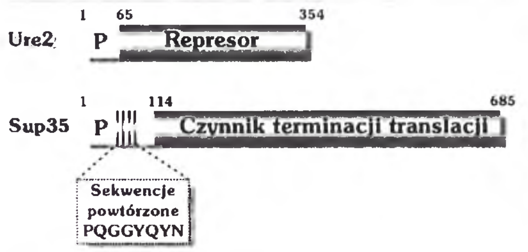


Ryc. 3. Własności genetyczne prionów drożdżowych. Segregacja mejotyczna.

IV. Domenowa struktura białek, które tworzą priony

Białka Ure2 i Sup35 nie wykazują żadnej wzajemnej homologii sekwencji, jednak mają pewne podobieństwo struktury. W obu przypadkach jest to struktura domenowa [10, 11]. Funkcja biologiczna białek Ure2 i Sup35 jest zdeterminowana przez ich C-końcowe domeny. Znacznie krótsze domeny N-końcowe posiadają niezwykłą kompozycję aminokwasów. W części N-terminalnej białka Sup35 znajduje się czterokrotne powtórzony układ dziewięciu aminokwasów PQGGYQYN. Sekwencja ta przypomina układ aminokwasów PHGGGWGQ, pięciokrotnie powtórzony w prionie PrP ssaków. Stwierdzono eksperymentalnie, że sekwencje PQGGYQYN odpowiadają za powstawanie prionu [PSI]. Delecja takich sekwencji powodowała zmniejszenie ilości generowanych mutantów [PSI], zaś wprowadzenie dodatkowych traktów PQGGYQYN powodowało zwiększe-

nie ich indukcji, połączone ze zwiększoną szybkością tworzenia agregatów prionu [12] (Ryc. 4).



Ryc. 4. Domenowa struktura białek Sup35 i Ure2. Literą P. oznaczono domeny odpowiedzialne za powstawanie prionów.

Chociaż w domenie N-końcowej białka Ure2 nie wystepują podobne powtórzenia, to specyficzny układ aminokwasów — trakty asparaginy i wysoka zawartość seryny oraz glutaminy — zapewnia podobieństwo struktury drugorzędowej do N-końcowych domen Sup35 i PrP. Struktura ta charakteryzuje się kompletnym brakiem motywów typu alfa-helisy i beta-kartki, a występowaniem skrętów [13]. Białko kodowane przez gen *het-s* nie posiada rejonów bogatych w glutaminę czy asparaginę [3]. Widocznie mechanizm powstawania prionu [het-s] jest odmienny od występującego u drożdży.

Domena N odpowiada za transmisję struktury prionów. Domena ta przybiera konformację prionu, a następnie, oddziałując z domenami N komórkowych białek Sup35 i Ure2, wymusza zmianę ich konformacji. Delecja fragmentu DNA kodującego domenę N-końcową nie powoduje inaktywacji aktywności biologicznej białek Sup35 i Ure2, lecz eliminuje występowanie fenotypów [PSI] i [URE]. Natomiast w obu przypadkach nadekspresja domeny N-końcowej z plazmidu kodującego tylko 5' cześć genu, zwiększa znacznie, nawet do 1000 razy, częstość indukcji prionów [9,10]. Analogiczna nadekspresja w szczepach, które posiadają prion działa destrukcyjnie, osłabiając wzrost takich szczepów [11, 14]. Domeny C odpowiadają w zasadzie za funkcję katalityczną białek Sup35 i Ure2, lecz wskutek określonych modyfikacji (np. delecji kilku aminokwasów z C-końca) mogą stymulować indukcję prionu [15, 16]. Znaleziono taki fragment wewnątrz domeny C białka Ure2, który odpowiada za indukcję prionu niezależnie od domeny N [15].

Wysoka aktywność generowania prionów przez N-końcowe fragmenty Sup35 i Ure2 sugeruje możliwość powstawania analogicznych, generujących priony fragmentów w komórce wskutek proteolizy przypadku gdy geny *SUP35* i *URE2* występują w postaci kompletnej [15]. Wiadomo, że agregaty β-amyloidu powstające w chorobie Alzheimera tworzy peptyd 40- lub 42-aminokwasowy powstający wskutek proteolizy większego prekursora [17]. Nie jest wykluczone, że również powstawanie włókien amyloidowych prionów bierze początek od mniejszych fragmentów białka-matrycy.

V. Hipotezy powstawania prionów

Konwersję białka Sup35 do formy prionu [PSI] odtworzono w warunkach *in vitro*, a [PSI] efektywnie inicjuje tego typu przemianę [18]. Niezależnie pokazano, że czyste białka Sup35 i Ure2 mogą tworzyć w roztworze włókna, podobne w swojej strukturze do włókien amyloidowych [19, 20]. Odkrycie to wskazuje na istnienie analogii między prionem i amyloidem [21].

W literaturze opisano dwie alternatywne hipotezy powstawania prionów. Zgodnie z hipotezą heterodimeru sformułowaną przez Prusinera [22] infekcyjne białko Prp^{Sc} może istnieć jako monomer i jako taki wiązać się z Prp^{C}. Przemiana Prp^{C} w prion jest katalizowana poprzez utworzony heterodimer. Następnie odbywa się dysocjacja dwóch cząsteczek Prp^{Sc}, które inicjują kolejny cykl. Model Prusinera zakłada, że agregacja Prp^{Sc} jest procesem wtórnym.

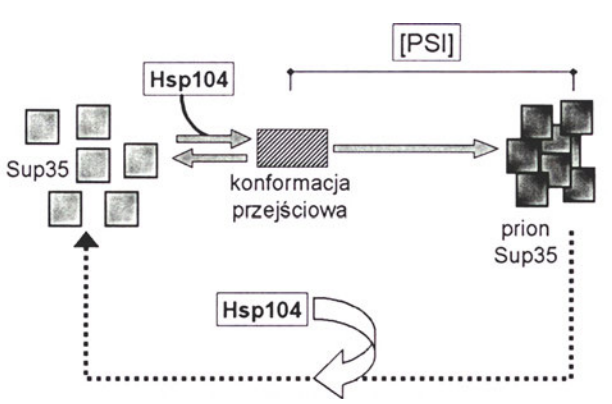
Druga hipoteza zakłada, że włókna amyloidowe prionu są regularnymi polimerami, które służą jako „zarodki" przyszłej polimeryzacji [23]. Szybkość konwersji jest limitowana powstawaniem takich „zarodków", a dodanie polimerów powstałych wcześniej znacznie przyspiesza proces. Zmiana konformacji cząsteczki białka zachodzi bądź spontanicznie, bądź jest wymuszana w momencie włączania do polimeru.

Choć obecnie trudno rozstrzygnąć, która z hipotez jest prawdziwa, należy zaznaczyć, że dane doświadczalne potwierdzają raczej hipotezę polimeryzacji. Frakcje „zarodków" prionów Prp czy też Sup35, które przyspieszają konwersję czystego białka w prion, identyfikowano w formie agregatów, a nigdy jako cząsteczki monomerów. Hipotezę polimeryzacji tłumaczy również obserwowane doświadczalnie zróżnicowanie prionów. Analogicznie jak odmienne jednostki chorobowe wiążą się z różnymi konformacjami prionu PrP [24], tak różne formy [PSI] powodują zróżnicowane fenotypy supresji w szczepach drożdży [25]. Trudno sobie wyobrazić, że cząsteczka monomeru może przybierać różne trwałe formy kon-

formacyjne, można natomiast założyć, że takie formy są stabilizowane w polimerze. Możliwość powstawania różnego typu polimerów Sup35 pokazano także w systemie *in vitro* [23].

Poparcie dla rewolucyjnej hipotezy prionów drożdżowych stanowi odkrycie, że kluczową rolę w dziedziczeniu [PSI] pełni białko opiekuńcze Hsp104. Okazało się, że nadprodukcja białka HSp104 w komórce powoduje inaktywację fenotypu [PSI] [26]. Jedyną znaną funkcją komórkową białka Hsp104 jest reaktywowanie struktur białkowych zmienionych wskutek stresu [27], a więc wpływ tego białka na dziedziczenie [PSI] stanowi dodatkowy argument przemawiający za tym, że przekazywanie informacji genetycznej może opierać się na transmisji konformacji białka.

Paradoksalnie, również Hsp104 jest niezbędne do indukcji prionu, gdyż mutanty [PSI] nie powstają w szczepie z nieaktywnym genem *HSP104* w chromosomie [26]. A więc stabilna konformacja prionu wymaga określonego poziomu białka Hsp104; gdy tego białka jest w komórce zbyt mało, lub też za dużo – nie obserwuje się fenotypu [PSI]. W badaniach *in vitro* z udziałem oczyszczonych białek w roztworze wykazano, że Hsp104 oddziałuje bezpośrednio z Sup35 i przyspiesza jego przemianę w prion [28]. Według hipotezy sformułowanej przez Lindquist rola Hsp104 polegałaby na nadaniu Sup35 takiej konformacji przejściowej, która umożliwiłaby jego oddziaływanie z „zarodkiem" prionu. W nieobecności Hsp104 taka konformacja nie byłaby możliwa, zaś w jego nadmiarze – skupiska Sup35 za bardzo rozproszone, aby utworzyć agregaty [26] (Ryc. 5). Kushnirov i Ter-Avanesyan proponują inne wytłumaczenie podkreślając aktywność Hsp104 we fragmentacji agregatów prionu [21].



Ryc. 5. Rola Hsp104 w dziedziczeniu [PSI]. Model S. Lindquist.

Według tych autorów Hsp104 nie jest niezbędne do powstawania prionu, lecz jego rola polega na umożliwieniu przekazywania prionów do komórek potomnych, co zachodzi pod warunkiem rozbicia włókien agregatów na mniejsze cząsteczki. Taka fragmentacja generuje nowe końce włókien i stymuluje dalszą polimeryzację. W nieobecności Hsp104 prion powstaje, ale, jako zbyt duży agregat, nie jest przekazywany do komórki potomnej. W nadmiarze Hsp104 agregaty ulegają rozbiciu, co obserwuje się jako inaktywację fenotypu [PSI].

Istnieją tylko pewne przesłanki na temat roli białek opiekuńczych w kontroli struktury prionu PrP u ssaków. Wiadomo, że do powstania prionu PrP^{Sc} konieczne jest białko Prp^{C}, ale bynajmniej nie jest powiedziane, że jest to element wystarczający. Według Kushnirova i Ter-Avanesyana różny stopień fragmentacji agregatów PrP decyduje o różnych własnościach prionów PrP stanowiących o syndromach różnych chorób u człowieka [21].

W eksperymentach *in vitro* stwierdzono specyficzne oddziaływanie Hsp104 z białkami Sup35, Prp a także z β-amyloidem [28]. Stwierdzono także, że Hsp104 ułatwia konwersję PrP do prionu. Wynik ten potwierdza sugestie udziału chaperonów w powstawaniu prionów i amyloidów u człowieka. Być może sterowanie ilością białek opiekuńczych mogłoby stanowić zasadę mechanizmu terapeutycznego w przypadku chorób określanych jako pasażowalne amyloidozy mózgowe.

VI. Badania biochemiczne i obserwacje mikroskopowe prionów

Kolejnym poparciem teorii prionów u niższych eukariontów są wyniki badań biochemicznych i mikroskopowych. Podobnie jak prion ssaczy PrP^{Sc} wykazuje zwiększoną oporność na działanie proteazy w porównaniu z białkiem komórkowym PrP^{C} , białko Sup35 ze szczepu [PSI] jest oporniejsze na trawienie proteazą niz białko Sup35 ze szczepu konrolnego [5, 29]. Niezależnie stwierdzono, że białko Ure2 wykazuje zwiększoną oporność na działanie proteazy w szczepach [URE] [10]. Analogicznie różnice obserwowano dla produktu genu *het-s* u *Podospora*, który był oporniejszy na działanie proteaz w ekstraktach szczepu [het-s] w porównaniu do [het-s*] [3].

W mutantach [PSI] i [URE] obserwowano odpowiednio frakcje białek Sup35 i Ure2 w postaci wysokocząsteczkowych agregatów. Stwierdzono także, że lizat z komórek [PSI] indukuje agregację Sup35 w szczepach kontrolnych [18, 29, 30].

Konwersję białka Sup35 do formy prionu można obserwować bezpośrednio w komórkach pod mikroskopem. W tym celu skonstruowano fuzję fragmentów DNA kodujących N-terminalną domenę Sup35 i

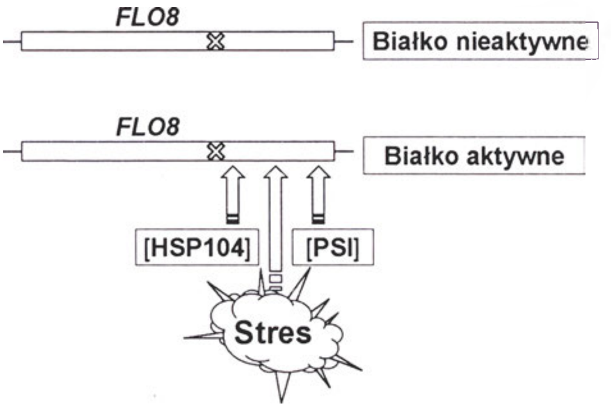
GFP, białko fluoryzujące na zielono. Po wprowadzeniu fuzji do szczepu kontrolnego obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym rozproszenie zabarwienia w obrębie komórki. Natomiast w szczepie [PSI] obserwowano świecące skupiska białka fuzyjnego. Występowanie takich agregatów było powtarzalne i obraz dziedziczył się w komórkach potomnych [29]. Analogiczne obserwacje udokumentowano dla fuzji Ure2-GFP [30].

VII. Fizjologiczna rola prionów u niższych eukariontów

Na zakończenie pytanie o funkcję fizjologiczną prionów u niższych eukariontów. Rola fizjologiczna [PSI] i [URE] nie jest jasna. Badano szczegółowo wpływ tworzenia prionu [URE] na regulację katabolizmu związków azotu i stwierdzono brak zależności między tymi procesami. W świetle ostatnio otrzymanych wyników nie można jednak wykluczyć, że mutacje w domenie C, uniemożliwiając oddziaływanie białka Ure2 z czynnikiem transkrypcyjnym Gln3, zwiększają indukcję prionu [URE]. Domena C pełniąc podstawową funkcję jako represor Gln3, stabilizuje także domenę N, a wspomniane mutacje inaktywują obie funkcje domeny C [15]. Istnieje tu analogia z dominującymi mutacjami w genie kodującym PrP u człowieka [24]. Tego typu mutacje powodują powstanie prionu, prawdopodobnie poprzez eliminację oddziaływań stabilizujących, które zostają zastąpione oddziaływaniami prowadzącymi do lawinowej agregacji. Rola wzajemnych oddziaływań domen Ure2 w regulacji metabolizmu związków azotu wymaga dalszych badań.

Analiza [PSI] wskazuje na udział prionów w adaptacji do warunków środowiska u drożdży. Domena N-końcowa białka Sup35 nie ma znaczenia dla jego funkcji fizjologicznej, a jednak jest konserwowana w ewolucji. Wskazuje to na rolę biologiczną warunkowanego przez tę domenę prionu. Być może rola [PSI] polega na zapewnieniu pewnego naturalnego poziomu supresji kodonów nonsens. Kompleksowa analiza sekwencji genomu drożdży pozwoliła na identyfikację kilku nieznanych, długich ramek odczytu zawierających wewnątrz pojedynczy kodon stop. Jednym z takich genów jest *FLO8,* wymagany do wzrostu w warunkach niedoboru związków azotu. Rola prionu [PSI] mogłaby polegać na kontroli supresji kodonu stop w takich szczególnych warunkach środowiska (Ryc. 6).

W naturalnym otoczeniu komórka drożdży musi borykać się z niekorzystnymi zmianami temperatury, brakiem dostępu do pożywienia, współzawodnictwem z innymi organizmami. Cenne okazać się mogą mechanizmy pozwalające na przetrwanie w określonych niszach ekologicznych, mechanizmy polegające na uruchomieniu ekspresji szczególnych genów. Udział prionu [PSI] w tego rodzaju mechanizmach jest wysoce prawdopodobny, tym bardziej, że prion ten jest kontrolowany przez białko Hsp104, które pomaga komórce w obronie przed stresami wywołanymi warunkami środowiska naturalnego [31].



Ryc. 6. Hipotetyczna rola [PSI] w ekspresji genów posiadających w swojej sekwencji kodon stop. Miejsce mutacji nonsens w przykładowym genie *FLO8 Saccharomyces cerevisiae* oznaczono gwiazdką.

Spośród poznanych dotychczas prionów, jedynie prion [het-s] pełni określoną rolę w komórce. Bierze on aktywny udział w tworzeniu bariery, która uniemożliwia krzyżowanie odmiennych grzybni *Podospora.* Sens fizjologiczny takiej bariery polega prawdopodobnie na uniemożliwieniu rozprzestrzeniania się wirusów. Zakłada się, że te same szczepy *Podospora* przenoszą te same wirusy, podczas gdy fuzje z odmiennymi grzybniami niosą prawdopodobieństwo infekcji odmiennymi wirusami.

Istnienie prionów u grzybów nitkowatych wydaje się być bardziej powszechne. Grzybnia *Podospora anserina*, podobnie jak innych grzybów nitkowatych, składa się ze strzępków zwanych septami. Pojedyncze komórki wewnątrz septum oddzielone są porowatą błoną umożliwiającą przepływ cytoplazmy. Z tego powodu rola czynników cytoplazmatycznych może być u tych grzybów znacząca. Ostatnio opisano u *Podospora anserina* cytoplazmatyczny czynnik C odpowiedzialny za specyficzny proces degeneracji grzybni w fazie stacjonarnej [32]. Propagacja czynnika C zależy od wierności translacji cytoplazmatycznej. Czynnik C dziedziczy się niezgodnie z prawami Mendla. Istnieje prawdopodobieństwo, że jest

to kolejny prion o konkretnej funkcji fizjologicznej w procesie starzenia.

Nie wiadomo jak szeroko w przyrodzie występuje zjawisko przenoszenia dziedzicznej informacji przez priony. Być może priony pośredniczą w procesach rozwoju i różnicowania u organizmów wyższych, lecz nie ma na to konkretnych danych.

Artykuł otrzymano 10 listopada 1999 r.
Zaakceptowano do druku 3 lutego 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M., Fletterick RJ, Prusiner SB (1994) *Science* **264**: 530-531
2. Wicker RB (1994) *Science* **264**: 530-531
3. Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9773-9778
4. Cox BS (1965) *Heredity* **20**: 505-521
5. Paushkin SV, Kushnirov V, Smirnov VN, Ter-Avanesyan M (1996) *EMBO* **15**: 3127-3134
6. Lacroute F (1971) *J Bacteriol* **106**: 519-522
7. Rizet G (1952) *Rev Cytol Biol Weg* **13**: 51-92
8. Wickner RB, Edskes HK, Meddelein ML, Taylor K, Moriyama H (1999) *J Biol Chem* **274**: 555-558
9. Ter-Avanesyan M., Dagkesmanskaya AR, Kushnirov V, Smirnov VN (1994) *Genetics* **137**: 671-676
10. Maisson DN, Wickner RB (1995) *Science* **270**: 93-95
11. Ter-Avanesyan M., , Kushnirov V, Dagkesmanskaya AR, Didichenko S.A., Chernoff YO, Inge-Vechtomov SG, Smirnov VN (1993) *Mol Microbiol* **7**: 683-692
12. Lindquist S, Liu JJ (1999) *Nature* **400**: 573-576
13. Tuite MF (1994) *Nature* **370**: 327-328
14. Maisson DC, Maddelein ML, Wickner RB (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:12503-12508
15. Maddelein ML, Wickner RB (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 4516-4524
16. Kochneva-Pervukhova NV, Poznyakovski AI, Smirnov VN, Ter-Avanesyan M (1998) *Curr Genet* 34: 146-151
17. Kisilevsky R, Fraser PE (1997) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**: 361-404
18. Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD (1997) *Science* **277**: 381-383
19. Glover JR, Kowal AS, Schrimer EC, Patino MM, Liu JJ, Lindquist S (1997) *Cell* **88**: 811-819
20. Thual C, Komar AA, Bousset L, Fernandez-Bellot E, Cullin C, Melki R (1999) *J Biol Chem* **274**: 13666-13674
21. Kushnirov VV, Ter-Avanesyan MD (1998) *Cell* **94**: 13-16
22. Prusiner SB (1991) *Science* **252**: 1515-1522
23. Jarret JT, Lansbury PT (1993) *Cell* **73**: 1055-1058
24. Gogiel T (1998) *Biotechnologia* **42**: 36-98
25. Derkatch IL, Chernoff YO, Kushnirov VV, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW (1996) *Genetics* **144**: 1375-1386
26. Chernoff Y, Lindquist S, Ono B, Inge-Vechtomov SG, Liebman SW (1995) *Science* **268**: 880-884
27. Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S (1994) *Nature* 372: 475-477
28. Schrimer EC, Lindquist S (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13932-13937
29. Patino MM, Liu JJ, Glover JR, Lindquist S (1996) *Science* **273**: 622-628
30. Edskes HK, Gray VT, Wickner RB (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1498-15003
31. Lidquist S (1997) *Cell* **89**: 495-498
32. Silar P., Haedens V, Rossignol M., Lalucque H (1999) *Genetics* **151**:87-95

Heterodimeryczne receptory jądrowe. I. Receptory witamin i hormonów

Heterodimeric nuclear receptors. I. Vitamin and hormone receptors

DANUTA KWIATKOWSKA[1], JANINA KWIATKOWSKA-KORCZAK[2]

Spis treści:

Contents:

Wykaz stosowanych skrótów: ATRA — kwas *all-trans*-retinowy; CAR — konstytutywny receptor androstanu; CYP — cytochrom P450; DBD — domena receptora wiążąca DNA, domena C; DR — proste powtórzenie oligonukleotydu w HRE; EcR — receptor 20-hydroksyekdyzonu; ER — odwinięte powtórzenie w HRE; FXR — receptor farnezoidów X; HETE — hydroksylowe pochodne kwasu eikozatetraenowego; HRE — element odpowiedzi hormonalnej, region DNA wiążący receptor; LBD — domena receptora wiążąca ligand , domena E; LXR — receptor wątrobowy X; PPAR — receptor aktywowany przez czynniki proliferacji peroksysomów; PTH — parathormon; PTHrP — peptyd pokrewny PTH (*Parathyroid hormone-related peptide*); PXR — receptor pregnanu X; RA — kwas retinowy; RAR — receptor kwasu retinowego; RXR — receptor kwasu 9-*cis*-retinowego; T_3 — trójjodotyronina; TR — receptor hormonów tarczycy; TRE — element rozpoznania receptora hormonów tarczycy w DNA; Usp — produkt genu *ultraspiracle;* VD — witamina D_3; VDR — receptor witaminy D_3; VDRE — element rozpoznania receptora VD w DNA.

I. Wstęp

Jądrowe receptory steroidów, retinoidów i innych hydrofobowych substancji są zaliczane do nadrodziny czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez ligandy. Cechuje je wysoka homologia strukturalna, obecność domen o jednakowej funkcji oraz zdolność wiązania się ze swoistym regionem DNA, zwanym elementem odpowiedzi hormonalnej, HRE (*hormone responsive element*), lub elementem docelowym, TE (*target element*). Region HRE większości znanych receptorów jądrowych (za wyjątkiem pewnych receptorów sierocych, działających jako monomery) składa się z dwu półmiejsc. Półmiejscem nazwano sekwencję nukleotydów, wiążących się z monomerem receptora. Zajęcie obu półmiejsc jest koniecznym warunkiem aktywności, dlatego wyłącznie dimer receptora spełnia swą funkcję biologiczną. Receptory związane z HRE ujawniają zdolność transaktywacji, tzn. aktywacji lub represji transkrypcji docelowych genów poprzez asocjację z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi, lub ich koaktywatorami.

Pierwsze odkryte u ssaków czynniki transkrypcyjne należące do tej nadrodziny, receptory hormonów steroidowych, są aktywne jako homodimery. Wkrótce jednak odkryto receptory kwasu retinowego (RA), występujące w postaci dwu form: RAR (receptor kwasu retinowego, *retinoic acid receptor*) i RXR (receptor kwasu 9-*cis* retinowego, *retinoid X receptor*) [1]. W ślad za tym wykazano, że receptor hormonów tarczycy (TR), związany z RXR ma daleko wyższe

[1]Dr hab., [2]prof. dr hab., Zakład Biochemii Lekarskiej AM, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

powinowactwo do swoistego elementu rozpoznania w DNA niż homodimer. Receptor witaminy D_3, VDR (*vitamin D_3 receptor*) oraz receptor aktywowany przez czynniki proliferacji peroksysomów, PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) aktywują ekspresję genów wyłącznie jako dimery z RXR [2]. Wkrótce zaczęły też napływać informacje o obecności licznych homologicznych białek jądrowych, występujących w komórkach ssaków, zdolnych do dimeryzacji z RXR i asocjacji z DNA. Uznano je za potencjalne receptory i określono mianem „receptorów sierocych". Z czasem udało się ustalić ligandy niektórych z nich [3].

Okazuje się, że nie tylko u ssaków, ale również u owadów występują czynniki transkrypcyjne, zależne od liganda i tworzące heterodimery. U *Drosophila* receptor steroidowego hormonu ekdyzonu jest aktywny w połączeniu z analogiem RXR, białkiem Usp. Można więc sądzić, że zjawisko heterodimeryzacji pojawiło sie w rozwoju filogenetycznym przed rozdzieleniem się bezkręgowców i kręgowców[4].

II. RXR — stały partner w heterodimerach

RXR wykazuje cechy strukturalne, właściwe wszystkim przedstawicielom nadrodziny receptorów jądrowych. Szczególnie wysoka homologia łączy go z rodziną, w skład której wchodzą receptory kwasu retinowego, hormonów tarczycy, witaminy D_3, kwasów tłuszczowych i pochodnych cholesterolu. W cząsteczce RXR wyróżnia się wszystkie domeny, charakterystyczne dla całej nadrodziny. Położona na C-końcu wielofunkcyjna domena E albo LBD (*ligand binding domain*) uczestniczy w wiązaniu liganda i dimeryzacji, a jej C-terminalny region, AF-2, także w transaktywacji. Wysoce konserwatywna domena C albo DBD (DNA *binding domain*) zbudowana z 66 reszt aminokwasowych, zawierająca dwa multicysteinowe palce cynkowe, rozpoznaje i wiąże region HRE w DNA. N-końcowe domeny A i B biorą udział w transaktywacji.

RXR łączy się z wyłącznie jednym izomerem kwasu retinowego, 9-*cis*-RA, podczas gdy ligandami RAR mogą być wszystkie izomery RA, zarówno naturalne, jak i ich syntetyczne analogi [5, 6].

Struktura miejsca wiążącego ligand w cząsteczce RXR została określona krystalograficznie. Składają się nań dwie antyrównolegle, α-helikalne „kanapki", ułożone w postaci dimerycznych jednostek. Sposób ułożenia kieszonki sugeruje, że ligand może w niej oddziaływać z wszystkimi modułami LBD, łącznie z AF-2. RXR tworzy zarówno homo- jak i heterodimery, ale jego powinowactwo względem heterologicznych receptorów jest znacznie wyższe. Powierzchnię homodimeryzacji w LBD tworzą dwie helisy i pętla. Stabilizują ją dwa hydrofobowe odcinki łańcucha polipeptydowego. W LBD mieści się kilka regionów heterodimeryzacji, nie całkowicie pokrywających się z modułem homodimeryzacji [7]. Transaktywacyjny region AF-2 może działać autonomicznie, zazwyczaj jednak funkcjonuje synergicznie z domenami A i B. Jak się wydaje, współdziałanie to ma wpływ na stopień i intensywność aktywacji promotorów genów docelowych [8].

Trzy odrębne geny kodują główne formy RXR. RXRα jest zbudowany z 467 reszt aminokwasowych, RXRβ — z 410, a RXRχ — z 463 reszt. Formy te są wzajemnie homologiczne w obrębie domen LBD w 88%, DBD — w 93%.

Dodatkowe podtypy RXR, występujące w różnych tkankach i na różnych etapach rozwoju osobniczego powstają drogą alternatywnego składania [6, 8].

III. Asocjacja heterodimerów z DNA

Sekwencja nukleotydów, rozpoznawana przez monomer i stanowiąca miejsce jego wiązania jest identyczna w przypadku wszystkich znanych heterodimerów występujących u ssaków. Stanowi ją heksanukleotyd AGGTCA. Oba półmiejsca są przeważnie ułożone jako proste powtórzenie, DR (*direct repeat*, → n →). Są one oddzielone od siebie o jeden do pięciu nukleotydów, co określa się jako reguła 1-5. Zdarzają się też ułożenia typu odwróconego, palindromowego powtórzenia, IR (*inverted repeat*, → n ←), również zgodne z regułą 1-5. Odstępstwem od tej reguły okazały się HRE typu odwiniętego powtórzenia, ER (*everted repeat*, ← n →). Receptor hormonów tarczycy wiąże się z ER-6. Receptory RA i witaminy D, mogą wiązać się z ER-8, ale obserwowano to jedynie w sztucznych układach *in vitro* i nie wiadomo, czy taki układ istnieje w komórkach.

Liczba nukleotydów oddzielających półmiejsca determinuje rodzaj heterodimeru wiązanego przez HRE. W Tabeli 1 przedstawiono typy HRE oraz ligandy receptorów tworzących dimery. Tak np. dimer RAR/RXR wiąże się z HRE typu DR-5 i DR-2, VDR/RXR — DR-3, TR/RXR — DR-4. RXR zajmuje półmiejsce w 5'-odcinku DNA, zaś jego partner — w odcinku 3'. Jedynym wyjątkiem okazał się dimer RAR/RXR, który wiąże się z nietypowym dlań HRE typu DR-1 w odwrotnej kolejności. Taki układ działa w wielu komórkach jako silny represor transaktywacyjnej funkcji homodimeru RXR [9].

Przy ułożeniu typu DR oba monomery znajdują się po tej samej stronie helisy DNA, zajmując przyległe głębokie rowki. Dodatkowa α-helisa, znajdująca się w C-końcowej wypustce LBD cząsteczki RXR umożliwia jej oddziaływanie także z płytkim rowkiem DNA, co rozszerza powierzchnię kontaktu poza HRE.

Zastanawiający wydawał się fakt, że tak wiele różnych receptorów wiąże się z tym samym partnerem, a każdy heterodimer rozpoznaje swoisty HRE w zależności od niewielkiej przecież różnicy liczby nukleotydów oddzielających półmiejsca. Krystalograficzne badania dimeru TR/RXR przyczyniły się do zrozumienia tego zjawiska. Tworząc modele o zmiennej długości łącznika wykazano, że zmiana o jeden nukleotyd powoduje obrót monomeru partnera o 36° wokół płytkiego rowka DNA, co wymusza zmianę położenia RXR i udostępnienie odpowiedniej powierzchni heterodimeryzacji w jego domenie E. Jak się wydaje, każdy z receptorów jądrowych ma tylko jeden motyw dimeryzacji, zaś RXR — komplet motywów, swoistych dla każdego partnera. Badania te wykazały także, że motywy dimeryzacji występują nie tylko w LBD, ale i w DBD. Inaczej niż w symetrycznych HRE hormonów steroidowych, ułożenie monomerów na DR wymusza wzajemne interakcje odmiennych miejsc domen DBD w RXR i jego partnerze. Reszty aminokwasowe drugiego palca cynkowego RXR reagują z pierwszym palcem cynkowym partnera dimeru. Utworzenie innego dimeru, niż jest to zaprogramowane w danym HRE stanowiłoby sferyczną przeszkodę asocjacji DBD z DNA. Interakcja HRE z właściwym heterodimerem umożliwia kooperatywność i wzmacnia wiązania powstające między DBD obu monomerów a półmiejscami HRE [10].

Przyjęto dwustopniowy model wiązania receptora z DNA po związaniu ligandów. Zakłada on, że najpierw łączą się odpowiednie motywy LBD obu monomerów i tworzy się rozpuszczalny dimer. Następnie DBD cząsteczki RXR wiąże się z 5'-półmiejscem HRE, co udostępnia półmiejsce 3' partnerowi. Po połączeniu domen E z HRE, także domeny C obu monomerów asocjują ze sobą. W zależności od rodzaju partnera oraz lokalizacji tkankowej, RXR może pełnić rolę biernego czynnika „naprowadzającego" właściwy receptor , bądź też wykazywać zdolność transaktywacyjną, właściwą dla swego liganda. W dimerach TR/RXR i VDR/RXR aktywność 9-*cis*-RA jest tłumiona, natomiast w PPAR/RXR i FXR/RXR oba monomery zachowują zdolność aktywacji transkrypcji odpowiednich genów [3, 11].

Tabela 1

Przykłady receptorów, tworzących dimery z RXR

Receptor	Konfiguracja HRE	Ligand
RXR	DR-1, IR-0	kwas 9-cis-retinowy
PPAR	DR-1	kwasy tłuszczowe, HETE, PGJ, fibraty, rezulina
RAR	DR-2, DR-5, IR-0	kwas retinowy
RAR*	DR-1	kwas retinowy
VDR	DR-3	1,25-dihydroksykalcyferol
TR	DR-4	hormony tarczycy
LXR	DR-4	oksosterole
FXR	IR-1	deoksycholany, farnezoidy u myszy
PXR	?	ksenobiotyki, endogenne steroidy
CAR**	DR-5	hamowany przez androstanol
NGFIB**	DR-5	
COUP**	DR-0	

* — hamuje transkrypcję, ** — aktywuje transkrypcję w nieobecności liganda; HRE — element odpowiedzi hormonalnej w DNA; DR — proste powtórzenie; IR — odwrócone (palindromowe) powtórzenie

IV. Receptory witamin i hormonów

IV-1. Receptory kwasu retinowego

Receptor kwasu retinowego (RAR) wiąże się ze wszystkimi izomerami kwasu retinowego jak ATRA, 9-*cis*-RA i 13-*cis*-RA. W obrębie tej grupy stwierdzono obecność trzech izoform RAR, oznaczanych odpowiednio jako α, β i γ. Izoformy różnią się swoimi właściwościami, a ich profil może się zmieniać w zależności od okresu rozwoju płodowego [5, 12].

W swojej budowie RAR jest bardzo zbliżony do RXR i z wyjątkiem domen A /B oraz obszaru AF-2 wykazuje znaczną z nim homologię. Domeny A i B

są odpowiedzialne za aktywność transaktywacyjną, niezależną od liganda. Domena C zawiera motywy charakterystyczne dla białek wiążących DNA, tzw. palce cynkowe. Miejsce wiązania RA znajduje się w domenie E (LBD), gdzie stwierdzono osobne centra dla poszczególnych ligandów. Domena E uczestniczy ponadto w dimeryzacji receptorów, jak również poprzez specyficzny region AF-2 ma zdolność oddziaływania z białkami aparatu transkrypcyjnego i dzięki temu może regulować ekspresję odpowiednich genów [13].

Stwierdzono, że RAR nie tworzy homodimerów i jedynie heterodimer RAR/RXR wykazuje aktywność biologiczną. Element odpowiedzi na RA składa się z dwóch heksanukleotydów (AGGTCA) oddzielonych od siebie pięcioma nukleotydami (DR-5).

Kwas retinowy poprzez swój receptor jest regulatorem wielu ważnych przemian zarówno w życiu pre- i postnatalnym. Reguluje ekspresję genów *hox* uczestnicząc w tworzeniu architektury ciała i wpływając na odpowiednie ułożenie komórek wzdłuż przednio-tylnej osi ciała . Niedobór RA, ale również i jego nadmiar są przyczyną poważnych nieprawidłowości rozwoju płodu [14, 15, 16].

Stwierdzono, ze kwas retinowy wywiera istotną rolę między innymi w proliferacji i różnicowaniu komórek nerwowych [17], keratynocytów [18, 19], komórek nabłonka oskrzeli [20]. Jest niezbędny w procesach widzenia, wpływa na rozwój fotoreceptorów oraz na procesy kształtowania siatkówki, soczewki i rogówki [21].

Kwas retinowy moduluje działanie wielu hormonów wpływając zarówno na syntezę, wydzielanie jak i ekspresję genu ich receptorów. RA stymuluje ekspresję genu receptorów adrenaliny, insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF), D2 dopaminy [22, 23, 24, 25], obniża syntezę receptora neuropeptydu Y [26]. Pod kontrolą RA jest synteza niektórych interleukin (IL-2, IL-4-, IL-4) [27, 28, 29].

RA wpływa na syntezę wielu enzymów, między innymi acylotransferazy lizofosfatyd-retinol [30], transferazy glutationowej [31], glukokinazy [32], karboksykinazy PEP [33], syntazy kwasów tłuszczowych [34].

Ze względu na swoje działanie prowadzące do zahamowania procesów wzrostu i podziałów komórkowych, stymulację procesów różnicowania jak również przypisywaną mu ostatnio zdolność uruchamiania sygnałów prowadzących do apoptozy, RA jest od szeregu lat przedmiotem szczególnego zainteresowania w terapii nowotworowej. Badania wykazały, że w niektórych typach nowotworów dochodzi do obniżenia lub zahamowania ekspresji genu RAR β [35- 37]. W licznych eksperymentach na komórkach pochodzących zarówno z linii prawidłowych jak i nowotworowych stwierdzono, że w obecności RA dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, obniżenia ekspresji cyklin D1, E [25], a w niektórych komórkach obserwuje się zwiększenie aktywności transglutaminazy oraz endonukleaz [38].

Wydaje się że RA może również wywierać hamujący wpływ na progresję nowotworów. Używając selektywnie działających agonistów receptorów retinoidów, wykazano, że prawdopodobnie dimer RAR/RXR hamuje ekspresję genów niektórych proteinaz jak stromielizyny i kolagenazy, związanych z powstawaniem przerzutów [39].

Mimo wielu doniesień molekularny mechanizm ewentualnego antynowotworowego działania RA nie został jednak jeszcze w pełni wyjaśniony, a wyniki nie zawsze całkowicie zgodne. Od szeregu lat RA stosowano w leczeniu białaczek promieloblastycznych. Prawdopodobnie jednak droga do szerokiego zastosowania RA w antynowotworowej terapii klinicznej jest jeszcze daleka.

IV-2. Receptor witaminy D.

Aktywna forma witaminy D_3 [1,25-dihydroksykalcyferol] ujawnia swoją aktywność biologiczną dzięki obecności wewnątrzkomórkowego receptora (VDR). Witamina D_3 (VD) łączy się z receptorem, tworząc kompleks VD/VDR, który po przyłączeniu RXR rozpoznaje charakterystyczną sekwencję (VDRE, element rozpoznania VD), znajdującą się zwykle przy 5` końcu promotorowego regionu genu docelowego. Składa się ona z dwóch heksanukleotydów o sekwencji AGGTCA oddzielonych od siebie trzema nukleotydami (Dr-3). RXR wiąże się do 5` końca ramienia VDRE, podczas gdy VDR do ramienia 3` [40].

Gen odpowiedzialny za syntezę VDR znajduje się na 12 chromosomie. Zawiera 11 eksonów, które wraz z intronami obejmują około 75 kb. Zidentyfikiwano 3 unikalne rodzaje mRNA powstające w wyniku alternatywnego składania eksonów. Sekwencja DNA, znajdująca się przed pierwszym eksonem 1A jest bogata w zasady GC i zawiera liczne potencjalne centra dla wiązania czynników transkrypcyjnych i innych kofaktorów [41].

Obecność VDR wykazano w szeregu tkanek jak jelito, kości, nerka, mięśnie, serce i mózg, głównie w jądrze komórkowym [42]. Ostatnie badania z użyciem pochodnej witaminy D_3 o normalnej aktywności biologicznej i wysokim powinowactwie wiązania z receptorem, a ponadto wykazującej specyficzną

właściwość wzmocnionej fluorescencji po związaniu z VDR, pozwoliły wykryć obecność VDR również w cytoplazmie, w endoplazmatycznym retikulum, aparacie Golgiego, mikrotubulach jak również w mitochondriach [43].

VDR zbudowany jest z około 420 aminokwasów i jak u pozostałych przedstawicieli rodziny, w jego cząsteczce można wyróżnić domeny charakterystyczne dla tej grupy czynników transkrypcyjnych. W domenie E położonej w C-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego znajduje się wysoce konserwatywny region AF-2, który jak wykazały badania może oddziaływać z koaktywatorami lub składnikami podstawowego kompleksu transkrypcyjnego. Niezbędna dla tej aktywności wydaje się być obecność Leu $_{417}$ i Glu $_{420}$ [44]. Badania receptorów VD z mutacjami w obrębie regionu AF-2 wykazały, że mimo wykazywania prawidłowości w wiązaniu liganda, możliwości tworzenia heterodimerów z RXR i rozpoznawania VDRE, nie dochodziło do transmisji sygnału [45].

Stymulowany przez VD proces transkrypcji wymaga specyficznego oddziaływania VDR z TFIIB, który jest składnikiem podstawowego kompleksu transkrypcyjnego. TFIIB jest wielodomenową cząsteczką białkową, której N-końcowy fragment jest niezbędny przy oddziaływaniu z domeną AF-2 VDR, podczas gdy pozostałe domeny umożliwiają wiązanie z innymi składnikami kompleksu transkrypcyjnego. Uważa się, ze interakcja VDR z TFIIB jest kluczowym etapem aktywacji indukowanego przez VD procesu transkrypcji [46].

Cechą charakterystyczną VDR jest krótka domena N-końcowa. Domena wiążąca DNA tworzy strukturę przestrzenną typu palców cynkowych jak u wszystkich przedstawicieli tej rodziny receptorów jądrowych, a w jej obrębie znajdują się sekwencje odpowiedzialne za rozpoznanie i łączenie z VDRE oraz za dimeryzację. Pomiędzy palcami cynkowymi zidentyfikowano sekwencję zawierającą 5 aminokwasów zasadowych. Jeżeli w wyniku mutacji dojdzie do zastąpienia aminokwasów zasadowych aminokwasami o innym charakterze lub ma miejsce delecja, taki receptor nie jest zdolny do łączenia z VDRE [47].

VDR jak wiele innych receptorów może ulegać fosforylacji. Jednym z centrów fosforylacyjnych jest Ser $_{51}$ leżąca w obszarze między palcami cynkowymi. Ser $_{51}$ jest zachowana we wszystkich poznanych dotąd VDR i jak się okazało może być substratem dla kinazy białkowej C-β. Ponieważ obecność aminokwasów zasadowych odgrywa szczególną rolę w wiązaniu VDR do VDRE, wprowadzenie ujemnego ładunku w tym obszarze prawdopodobnie osłabia wiązanie VDR z DNA, co może mieć znaczenie regulatorowe [48].

Jak wykazały badania, stabilność kompleksu VDR/RXR zależy od obecności i kolejności wiązania ligandów czyli VD i 9-*cis*-RA. Uważa się, że heterodimer VDR/RXR może powstać w nieobecności ligandów. Jest to tzw. apoheterodimer, który po połączeniu z VD ulega zmianom konformacyjnym, prawdopodobnie w domenie wiążącej ligand. Zmiany mogą być przenoszone na inne obszary cząsteczki, umożliwiając wiązanie kompleksu RXR/ VDR-VD do VDRE. Istniejący w takiej konformacji kompleks nie jest jednak trwały. Przyłączenie 9-*cis*-RA powoduje jego dysocjację, prowadząc do utworzenia dimerów RXR/RXR, wiązania go do odpowiedniego VDRE i ewentualnego uruchomienia innych szlaków sygnałowych. Jeżeli D_3 przyłączy się do VDR przed utworzeniem heterodimeru, to dochodzi do zmian konformacyjnych, które sprawiają, że kompleks jest trwały, nie ulega rozpadowi w obecności 9-*cis*-RA i wiążę się z VDRE z dużym powinowactwem i specyficznością [49] (Ryc. 1).

Najwcześniej poznaną funkcją VD jest udział w utrzymaniu homeostazy wapnia, co przejawia się w regulacji ekspresji genów białek wiążących wapń oraz enzymów i hormonów zaangażowanych w ten proces. Sekwencje VDRE znaleziono w promotorowym regionie ludzkiej i szczurzej osteokalcyny [50] i mysiej osteoponiny [51].

VD indukuje wzmożoną syntezę kalbindyny, białka wiążącego wapń w jelicie (Ca BP 9K). W badaniach *in vitro* i *in vivo* pokazano, że trójjodotyronina (T_3) może osłabiać działanie VD. Nie zaobserwowano jednak tworzenia dimerów TR/VDR i wiązania do VDRE. Wydaje się, że efekt słabszej odpowiedzi mógł być spowodowany odłączeniem RXR od heteromeru VDR/RXR i wykorzystaniem go do utworzenia innego heterodimeru TR/RXR [52].

Wyniki badań pokazują, że VD może modulować metabolizm wapnia w wielu komórkach. W hodowlach osteoblastów wzmaga syntezę kalbindyny-D28K i osteoponiny jak również ma wpływ na fosforylację tego białka [53].

Wykazano, ze TNFa, który przyczynia się do utraty masy kostnej w osteoporozie, obniża zdolność wiązania VDR/RXR do VDRE genu osteoponiny prawdopodobnie poprzez aktywację jądrowego inhibitora [54].

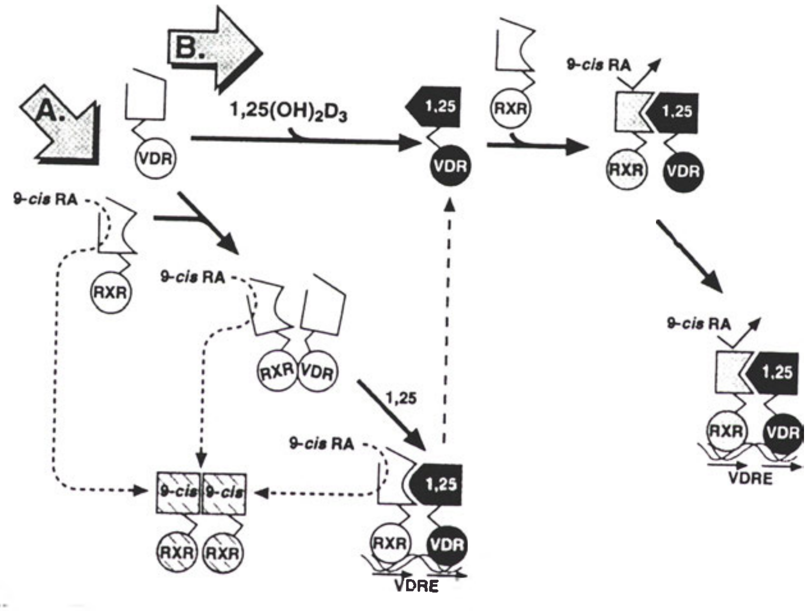
Aktywna forma VD wzmaga stymulowany przez PTH transport wapnia w kanalikach dystalnych. Zaobserwowano wzmożoną ekspresję genu receptora PTH/PTHrP. Stymulacja jest specyficzna, dotyczy tylko receptora PTH/PTHrP, nie mając wpływu na

receptory adrenergiczne ani na wymieniacze Na/H. Nieaktywna forma VD, $24,25(OH)_2$-D_3 nie wpływa na ekspresję receptora parathormonu. Wzmożenie syntezy receptora PTH/PTHrP zaobserwowano w obecności obydwu ligandów, VD i 9-*cis*-RA, podczas gdy sam 9-*cis*-RA nie posiada takich właściwości. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że obecność obydwu ligandów wzmaga również oddziaływanie receptora PTH/PTHrP z błonami komórkowymi [55].

Jak się okazuje VD jest również ważnym regulatorem homeostazy fosforanów. Wpływa na ekspresję genów nerkowych transporterów P_i. W regionie promotora genu transportera fosforanu typu II, zależnego od Na zidentyfikowano sekwencję, która jest rozpoznawana przez heterodimer VDR/RXR [56].

że zarówno 9-*cis*-RA jak i ATRA znosiły pro-różnicującą aktywność VD [57, 58].

Mechanizmy prowadzące do hamowania podziałów komórkowych nie są jeszcze całkowicie wyjaśnione. Zaobserwowano, że wiązanie heterodimeru VDR/RXR w regionie promotora genu inhibitora kinaz cyklinozależnych, białka p21 wpływa pozytywnie na jego transkrypcję. Stwierdzono również, że VD może mieć wpływ na zmiany aktywności enzymów, które są zaangażowane w inne szlaki sygnałowe. Inkubacja mysich keratynocytów z VD stymulowała ekspresję genu odpowiedzialnego za syntezę fosfolipazy D-1. Stwierdzano wzrost całkowitej aktywności fosfolipaz jak również wzmożoną aktywność transglutaminazy uważanej w tych komórkach za marker różnicowania [59].



Ryc.1. Rola ligandów w wiązaniu heterodimerów VDR/RXR do DNA (wg [49], za zgodą autora). VDR i RXR mogą łączyć się ze sobą w nieobecności ligandów tworząc tzw. apoheterodimer. Po przyłączeniu D_3 do VDR, heterodimer wiąże się z VDRE, lecz utworzony kompleks nie jest stabilny i w obecności 9-*cis* RA może ulegać dysocjacji [**A**]. Połączenie D_3 z VDR przed utworzeniem heterodimeru prowadzi do zmian konformacyjnych, dzięki którym powstający heterodimer jest trwały, niewrażliwy na 9-*cis* RA i wiąże się z VDRE z dużą specyficznością i powinowactwem [**B**].

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień o udziale VD w procesach wzrostu i różnicowania wielu typów komórek, zarówno normalnych jak i nowotworowych. W komórkach keratynocytów ludzkich posiadających receptory zarówno dla VD jak i retinoidów stwierdzono, że VD wywiera wyraźny wpływ hamujący na proliferację komórek oraz wzmaga procesy różnicowania. Retinoidy, zarówno 9-*cis*-RA jak i ATRA wykazywały słaby stymulujący wpływ na proliferację, natomiast w kombinacji z VD częściowo znosiły jej antyproliferacyjną aktywność. W obecności VD w wielu komórkach stwierdzano zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, podczas gdy obecność RA wyraźnie to działanie VD osłabiała. Badania wykazały również,

Antyproliferacyjne i proróżnicujące działanie VD potwierdzono w badaniach na wielu liniach komórek nowotworowych. VD jest potencjalnym negatywnym regulatorem wzrostu komórek raka sutka (MCF-7). Indukuje ona powstawanie morfologicznych i biochemicznych markerów apoptozy (kondensację matriks jądrowego i fragmentację DNA) [60].

W komórkach nowotworowych prostaty (LN CaP) zaobserwowano zmniejszoną ilość komórek w fazach G2, M i S, za to zwiększoną ilość w fazie G1/Go, zwiększenie stężenia inhibitora kinaz cyklinozależnych p21 i obniżenie aktywności kinazy CDK2. W tym przypadku 9-*cis*-RA działał synergistycznie z VD [61]. Również w komórkach adenoma

VD i jej aktywne analogi wyraźnie osłabiały tempo podziałów komórkowych, co wskazuje na pozytywną rolę VD i uzasadnia podjęcie ewentualnych prób wykorzystania tych właściwości *in vivo* w nowotworach jelita [62].

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień o nowych aktywnościach biologicznych VD. Wydaje się, że VD może mieć wpływ na ekspresję genu ludzkiego hormonu wzrostu [63], oraz czynnika wzrostu nerwów (NGF) [64-66], wzmagać ekspresję genu 24-hydroksylazy [67], anhydrazy węglanowej [68], receptora LDL [68], hamować ekspresję genu ANP [70] oraz genu IL-8 indukowanego przez TNFα [71].

Pojawiają się również doniesienia o działaniu VD na system immunologiczny. Eksperymenty na myszach sugerują, że VD i jej aktywne analogi mogą być użyteczne w leczeniu schorzeń autoimmunologicznych, a w przyszłości być może stosowane jako leki przeciwdziałające odrzucaniu przeszczepów w terapii immunosupresyjnej [40].

IV-3. Receptory hormonów tarczycy

Receptory hormonów tarczycy TRα i TRβ kodowane są przez geny znajdujące się na chromosomach 17 i 3. W wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu możliwe jest powstawanie czterech izoform TR oznaczanych odpowiednio jako $TR\alpha_1$ i α_2 oraz $TR\beta_1$ i β_2 [72,73]. TR posiada wszystkie domeny charakterystyczne dla tego typu receptorów wewnątrzkomórkowych. Domena AF-1 w regionie A/B jest odpowiedzialna za transmisję sygnału niezależną od liganda. Okazuje się, że w przypadku tego receptora utrata domeny A/B nie wpływa na jego właściwości [74]. Pozostałe domeny wykazują typowe funkcje charakterystyczne dla całej rodziny receptorów jądrowych [3, 75].

Stwierdzono, ze w obrębie domeny D niezwykle istotna jest obecność dwóch sekwencji zawierających aminokwasy zasadowe: Lys_{134}-Arg-Lys oraz Arg_{188}-Arg-Lys w $TR\alpha_1$ i podobnych sekwencji w receptorze $TR\alpha_2$. Okazuje się, że jedna z tych sekwencji jest niezbędna w procesie translokacji receptora do jądra komórkowego, podczas gdy obecność obydwu warunkuje możliwość transmisji sygnału i dzięki temu regulację ekspresji odpowiednich genów [76].

Porównanie sekwencji aminokwasowej TRα i TRβ wskazuje na znaczny stopień homologii z wyjątkiem domen A/B [77].

Badania immunologiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko TR sugerowały obecność receptorów hormonów tarczycy tylko w jądrze komórkowym i sądzono, że są one związane z DNA również w nieobecności liganda. Bardziej czułe metody z zastosowaniem fluoryzującego białka GFP (*green fluorescent protein*), które połączono z N-końcowym fragmentem $TR\beta_1$, co nie powodowało jednak zmian w zdolności łączenia z T_3 ani nie zmieniało transkrypcyjnej aktywności receptora, wykazały obecność $TR\beta_1$ również w cytoplazmie. Stosunek $TR\beta_1$ znajdowanego w jądrze do ilości występującej w cytoplazmie zależał od obecności T_3. W nieobecności T_3 wynosił około 1,5, podczas gdy w obecności T_3 wartość ta wzrastała do 5,5. Na podstawie tych badań można sądzić, że T_3 wzmaga translokację receptora z cytopazmy do jądra, a możliwość zmian w dystrybucji TR pomiędzy jądrem a cytoplazmą zależna od T_3 może być czynnikiem regulującym aktywność transkrypcyjną.[78].

TR regulują transkrypcję genów docelowych wiążąc się do odpowiedniego TRE składającego się z dwóch 6-nukleotydowych sekwencji rozdzielonych przez 4 nukleotydy (Dr-4) lub do tzw. odwiniętego powtórzenia heksapeptydów rozdzielonych sześcioma nukleotydami, określanych jako ER-6 [79,80].

TR może wiązać się z TRE w nieobecności ligandów jako monomer, homodimer lub heterodimer z RXR . Dodanie T_3 osłabia wiązanie dimerów $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$ jak również TR α/TRβ do TRE, co może w efekcie prowadzić do odłączenia receptorów i braku odpowiedzi. Takiego efektu nie obserwuje się w obecności T_3 i heterodimeru TR/RXR. Prawdopodobnie obecność RXR w dimerze zwiększa powinowactwo do TRE. Wydaje się więc, że heterodimer TR/RXR jest najbardziej stabilny i odgrywa najważniejszą rolę w regulacji transkrypcji genów zależnej od T_3 [81, 82, 83].

Obecnie wiadomo, że procesy regulacji transkrypcji zależą nie tylko od obecności receptorów, ich ligandów i określonego typu TRE, ale również od szeregu innych białek zwanych korepresorami i koaktywatorami.

Receptor, który nie jest związany z ligandem po połączeniu z TRE może hamować transkrypcję wiążąc się z białkowymi korepresorami. Takim znanym korepresorem jest kompleks trzech białek, z których jedno posiada aktywność deacetylazy histonów. Jakkolwiek proces ten nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony, to uważa się, że deacetylacja histonów powoduje zmiany konformacyjne w budowie chromatyny, czego wynikiem jest utrudniony dostęp czynników transkrypcyjnych i co w efekcie prowadzi do zahamowania transkrypcji. Wiązanie liganda indukuje zmiany konformacyjne prowadzące do

uwolnienia korepresorów, powiązania z koaktywatorami poprzez domeną AF-2, acetylację histonów przez jeden z koaktywatorów jakim jest acetylotransferaza, „rozluźnienie" struktury chromatyny ułatwiające dostęp czynnikom transkrypcyjnym i aktywację transkrypcji [84, 85, 86, 87].

Hormony tarczycy uważa się za niezbędne dla prawidłowego rozwoju, wzrostu i regulacji szeregu procesów matabolicznych. Obecność izoform TR wykryto w większości tkanek. Ekspresję genów TRα i TRβ stwierdzono na różnych etapach rozwoju embrionalnego oraz różnych stadiach metamorfozy płazów [88, 89]. Zarówno TR jak i RXR są niezbędne do przekazywania sygnałów T_3 w rozwoju embrionalnym *Xenopus Laevis* [90].

Sekwencje TRE znaleziono między innymi w promotorowym obszarze szczurzego genu hormonu wzrostu [91], genu tyreotropiny β [92], głównego białka mieliny [93], ciężkiego łańcucha miozyny [94], dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej [95], anhydrazy węglanowej II [96] i lizozymu [97].

Stwierdzono, że TRα i TRβ mogą różnić się w swoim działaniu, jakkolwiek molekularne podstawy takiej odmiennej aktywności nie zostały dotąd dostatecznie wyjaśnione. Wiadomo, że np. T_3 poprzez receptor $TR\beta_1$ hamuje ekspresję genu tyreotropiny, podczas gdy $TR\alpha_1$ takiego działania nie wykazuje [98]. Być może jest to związane z właściwościami poszczególnych izoform TR. Wiadomo, że $TR\beta_1$ częściej tworzy homodimery niż $TR\alpha_1$ co może być przyczyną różnic w powinowactwie do określonego TRE [77].

Jednym z ważniejszych docelowych organów działania hormonów tarczycy jest wątroba, gdzie ekspresja wielu genów, między innymi enzymu jabłczanowego i typu I 5`dejodynazy jest pod kontrolą T_3. W wątrobie znaleziono przede wszystkim TRβ, który tworzy heterodimer z RXR. Badania wykazały, że wewnątrzkomórkowe trawienie receptora RXR przez katepsynę L może być jednym z potencjalnych mechanizmów regulacji działania TR [99].

Stwierdzono, że T_3 jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego, a ekspresja rodzaju izoformy TR zależy od stadium rozwoju. W okresie embrionalnym mózgu szczura stwierdzono występowanie $TR\alpha_1$, podczas gdy po urodzeniu dominującą formą był $TR\beta_1$. T_3 poprzez swoje receptory reguluje wzrost i dojrzewanie neuronów, powstawanie synaps oraz proces mielinizacji. Niedobór T_3 w okresie sześciu miesięcy po urodzeniu człowieka prowadzi do nieodwracalnych zmian w rozwoju umysłowym [100].

Stwierdzono, ze T_3 poprzez heterodimer TR/RXR hamuje ekspresję genu β-amyloidu, prekursora białka APP w komórkach neuroblastoma, które odgrywa kluczową rolę w rozwoju choroby Alzheimera [101].

Badania wskazują, że TR może tworzyć dimery również z RAR. Wydaje się, że poprzez tego typu heterodimery T_3 może wpływać na ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę niektórych enzymów jak wątrobowej glukokinazy [102], czy karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej [103], regulować syntezę keratyny [104] czy modulować procesy erytropoezy [105].

V. Uwagi końcowe

Witamina D_3, pochodne witaminy A oraz hormony tarczycy mają udział w regulacji wielu podstawowych procesów życiowych. Mimo różnic w swojej strukturze chemicznej, ich receptory wchodzą w skład homologicznej rodziny białek jądrowych o charakterystycznej budowie, wiążą się z pokrewnymi elementami odpowiedzi w DNA i wykazują podobny mechanizm działania. Rodzinę heterodimerycznych receptorów jądrowych cechuje zdolność asocjacji z receptorem kwasu 9-*cis*-retinowego, co jest niezbędnym warunkiem ich aktywności biologicznej. Rzuca to nowe światło na znaczenie retinoidów w regulacjach procesów metabolicznych z udziałem witaminy D_3, hormonów tarczycy oraz wielu innych ligandów heterodimerycznych receptorów. Obecność elementów odpowiedzi na receptory heterodimeryczne w promotorach wielu genów sprawia, że działanie ich ligandów jest wielokierunkowe.

Artykuł otrzymano 27 stycznia 2000 r.
Zaakceptowano do druku 31 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Mangelsdorf D, Eng ES, Dyck JA, Evans RM (1990) *Nature* **345**: 224-229
2. Glass CK (1994) *Endocrinol Rev* **15**: 391-407
3. Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) *Cell* **83**: 841-850
4. Ożyhar A (1994) *Post Bioch* **40**: 230-239
5. Pemrick SM, Lucas DA, Grippo JF (1994) *Leukemia* **8**: 1797-1806
6. Kwiatkowska D, Kwiatkowska-Korczak J (1999) *Post Biol Kom* **26**: 579-592
7. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) *Nature* **375**: 377-382
8. Negpal S, Friant S, Nakhshadori H, Chambon P (1993) *EMBO J* **12**: 2349-2360
9. Kurokawa R, DiRenzo J, Boehm M, Sugerman J, Gloss B, Rosenfeld MG,Heyman RA, Glass CK (1994) *Nature* **371**: 528-531
10. Rastinjead F, Perlman T, Evans RM, Sigler PB (1995) *Nature* **375**: 203-211

11. Leblanc BP, Stunnenberg HG (1995) *Genes Dev* **9**: 1811-1816
12. Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) *Cell* **83**: 859-869
13. Keidel S, Lamour FP, Apfel CM (1997) *J Biol Chem* **272**: 18267- 18272
14. Gudas LJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 15399-15402
15. Kwiatkowska J (1992) *Post Bioch* **38**: 32-36
16. Mangiarotti R, Danova M, Alberici R, Pellicciari C (1998) *Br J Cancer* **77**:186-191
17. Cosgaya JM, Recio JA, Aranda A (1997) *Oncogene* **15**: 1687-1696
18. Kakizuka A (1997) *Leukemia* **3**: 378-379
19. Magrau-Peya E, Salomon D, Saurat JH, Meda P (1997) *J Histochem Cytochem* **45**: 1207-1210
20. Lee WK, Dohi JM, Kim YH, Walsh GL, Consoli V, Andreeff M, Dawson Hong WK, Kurie JM (1997) *J Clin Invest* **101**: 1012-1019
21. Hyatt GA, Dowling JE (1997) *Invest Ophtalmol Vis Sci* **38**: 1471-1475
22. Bahouth SW, Beauchamp MJ, Park EA (1998) *Biochem Pharmacol* **55**:215-225
23. Gabbitas B, Canalis E (1997) *J Cell Physiol* **172**: 253-264
24. Han GR, Dohi DF, Lee HY, Rajah R, Walsh GL, Hong WK, Cohen P, Rurie JM (1997) *J Biol Chem* **272**: 13711-13716
25. Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borelli E (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14349-14354
26. Mannon PJ, Keiser LM (1997) *J Neurochem* **68**: 20-25
27. Ballow M, Xiang S, Greenberg SJ, Brodsky L, Allen C, Rich G (1997) *Int Arch Allergy Immunol* **113**: 167-169
28. DiSepio D, Malhotra M, Chandraratna RA, Nagpal S (1997) *J Biol Chem* **272**:25555-25559
29. Napolitano M, Bellavia D, Maroder M, Farina M, Vacca A, Frati L, Gulino A, Screpenti I (1997) *Thymus* **24**: 247-261
30. Shimada T, Ross AC, Muccio DD, Brouilette WJ, Shealy YF (1997) *Arch Biochem Biophys* **344**: 220-227
31. Lo HW, Ali-Osman F (1997) *J Biol Chem* **272**: 32743-32749
32. Decaux JF, Juanes M, Bossard P, Girard J (1997) *Mol Cell Endocrinol* **130**: 61-67
33. Park EA, Song S, Olive M, Roesler WJ (1997) *Biochem J* **322**: 343-349
34. Roder KH, Wolf SS, Schweizer M (1997)*Biochem Soc Trans* **25**: 157S
35. Widschwendter M, Berger J, Daxenbichler G, Muller-Holzner E, Widschwendter A, Mayr A, Marth C, Zeimet AG (1997) *Canc Res* **57**: 3158-3161
36. Mc Gregor F, Wagner E, Felix D, Soutar D, Parkinson K, Harrison PR (1997) *Cancer Res* **57**: 3886-3889
37. Li C, Wan YJ (1998) *Cancer Lett* **124**: 205-211
38. Shondy Z, Reichert U, Ernardon JM, Michel S, Oth R, Ancian P, Ajzner E, Fesus L (1997) *Mol Pharmacol* **51**: 972-982
39. Guerin E, Ludwig MG, Basset P, Anglard P (1997) *J Biol Chem* **272**: 11088-11095
40. DeLuca HF, Zierold C (1998) *Nutr Rev* **56**: S4-10
41. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW (1997) *Mol Endocrinol* **11**: 1165-1179
42. Zanello SB, Collins ED, Marinissen MJ, Norman AW, Boland RL (1997) *Horm Metab Res* **29**: 231-236
43. Barsony J, Renyi I, McKoy W (1997) *J Biol Chem* **272**: 5774-5782
44. Jurutka PW, Hsieh JC, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Haussler CA, Blanco JC, Ozato K, Haussler MR (1997) *J Biol Chem* **272**: 14592-14599
45. Masuyama H, Brownfield CM, Arnaud R, Mac-Donald PN (1997) *Mol Endocrinol* **11**: 1507-1517
46. Blanco JCG, Wang I-M, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley WB, Jurutka PW, Haussler MR, Ozato K (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1535-1539
47. Hsieh J-C, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Haussler CA, Jurutka PW, Haussler MR (1998) *J Cell Biochem* **70**: 94-109
48. Hsieh J-C, Jurutka PW, Nakajima S, Galligan MA, Haussler CA, Shimizu Y, Shimizu N, Whitfield GK, Haussler MR (1993) *J Biol Chem* **268**: 15118 –15126
49. Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Whitfield GK, Haussler MR (1998) *J Biol Chem* **273**: 8483-8491
50. Ozono K, Liao J, Kerner SA, Scott RA, Pike JW (1990) *J Biol Chem* **265**: 21881-21888
51. Noda M, Vogel RL, Craig AM, Prahl J, DeLuca HF, Denhardt DT (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9995-9999
52. Raval-Pandya M, Freedman LP, Li H, Christakos S (1998) *Mol Endocrinol* **12**: 1367- 1379
53. Satran JB, Butler WT, Farach-Carson MC (1998) *J Biol Chem* **273**: 29935-29941
54. Fernandez-Martin JL, Kurian S, Farmer P, Nanes MS (1998) *Mol Cell Endocrinol* **141**: 65-72
55. Sneddon WB, Barry EL, Coutermarsh BA, Gesek FA, Liu F, Friedman PA (1998) *Cell Physiol Biochem* **8**: 261-277
56. Taketani Y, Segawa H, Chikamori M, Morita K, Tanaka K, Kido S, Yamamoto H, Iemori Y, Tatsumi S, Tsugawa N, Okano T, Kobayashi T, Miyamoto K, Takeda E (1998) *J Biol Chem* **273**: 14575-14581
57. Sorensen S, Solvsten H, Politi Y, Kragballe K (1997) *Skin Pharmacol* **10**: 144-152
58. Segaert S, Garmyn M, Degreef H, Bouillon R (1997) *J Invest Dermacol* **109**: 46-54
59. Griner RD, Qin F, Jung E, Sue-Ling ChK, Craford KB, Mann-Blakeney R, Bollag RJ, Bollag WB (1999) *J Biol Chem* **274**: 4663-4670
60. Narvaez CJ, Welsh J (1997) *Endocrinology* **138**: 4690-4698
61. Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW, Weigel NL (1997) *Endocrinology* **138**: 1491- 1497
62. Tong WM, Bises G, Sheinin Y, Ellinger A, Genser D, Potzi R, Wrba F, Wenzl I, Roka R, Neuhold N, Peterlik M, Cross HS (1998) *Int J Cancer* **75**: 467-472
63. Alonso M, Segura C, Dieguez C, Perez-Fernandez R (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 882-887
64. Veenstra TD, Fahnestock M, Kumar R (1998) *Biochemistry* **37**: 5988-5994
65. Musiol IM, Feldman D (1997) *Endocrinology* **138**: 12-18
66. Cornet A, Baudet C, Neveu I, Baron-Van Evercooren A, Brachet-Navetinan P (1998) *J Neurosci Res* **53**: 742-746
67. Kang S, Li XY, Duell EA, Voorhees JJ (1997) *J Invest Dermatol* **108**: 513-518
68. Quelo I, Machuca I, Jurdic P (1998) *J Biol Chem* **273**: 10638-10646
69. Kohno M, Takahasi S, Oida K, Suzuki J, Tamai T, Yamamoto T, Nakai T (1997) *Atherosclerosis* **133**: 45-49
70. Chen S, Wu J, Hsieh JC, Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler MR, Gardner DG (1998) *Hypertension* **31**: 1338-1342
71. Harant H, Andrew PJ, Reddy GS, Foglar E, Lindley IJ (1997) *Eur J Biochem* **250**: 63-71
72. Evans RM (1988) *Science* **240**: 889-895
73. Lazar MA (1993) *Endocrinol Rev* **14**: 184-193
74. Link K, Parkinson C, McPhie P, Cheng S (1991) *Mol Endocrinol* **5**: 485-492
75. Wagner RL, Aprietti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ (1995) *Nature* **378**: 690-697
76. Lee Y, Mahdavi V (1993) *J Biol Chem* **268**: 2021-2028

77. Zhu X-G, McPhie P, Lin K-H, Cheng S-Y (1997) *J Biol Chem* **272**: 9048- 9054
78. Zhu X-G, Hanover A, Hager GL, Cheng S-Y (1998) *J Biol Chem* **273**: 27058-27063
79. Cheng S-Y (1995) *J Biomed Sci* **2**: 77-89
80. Oppenheimer JH, Schwartz HJ, Strait KA (1994) *Eur J Endocrinol* **130**: 15-24
81. Yen PM, Sugawara A, Chin W (1992) *J Biol Chem* **267**: 23248-23252
82 Yen PM, Darling DS, Carter RL, Forgione M, Umeda PK, Chin WW (1992) *J Biol Chem* **267**: 3565-3568
83. Rosen ED, Benighof EG, Koenig RJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 11534-11541
84. Wolffe AP (1997) *Nature* **387**: 16-17
85. Nagy L, Kao H-Y, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM (1997) *Cell* **89**: 373-380
86. Heizel T, Lavinski RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang W-M, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1997) *Nature* **387**: 43-48
87. Chen JD, Evans RM (1995) *Nature* **377**: 454-457
88. Strait KA, Schwartz HL, Perez-Castillo A, Oppenheimer JH (1990) *J Biol Chem* **265**: 10514-10521
89. Shi YB (1994) *Trends Endocrinol Metab* **5**: 14-20
90. Puzianowska-Kuznicka M, Damjanovski S, Shi YB (1997) *Moll Cell Biol* **17**: 4738-4749
91. Koenig RJ, Brent GA, Warne RL, Larsen PR, Moore DD (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5670-5674
92. Carr FE, Burnside J, Chin WW (1989) *Mol Endocrinol* **3**: 709-716
93. Farsetti A, Mitsuhashi T, Desvergne B, Robbins J, Nikodem VM (1991) *J Biol Chem* **266**: 23226-23232
94. Izumo S, Mahdavi V (1988) *Nature* **334**: 539-542
95. Petty KJ, Desvergne B, Mitsuhashi T, Nikodem VM (1990) *J Biol Chem* **265**: 7395-7400
96. Disela C, Glineur C, Bugge T, Sap J, Stengl G, Dodgson J, Stunnberg H, Beug H, Zenke M (1991) *Gen & Dev* **5**: 2033-2047
97. Baniahmad A, Steiner C, Kohne AC, Renkawitz R (1990) *Cell* **61**: 505-514
98. Lezoualc`h F, Hassan AH, Giraud P, Loeffer JP, Lee SL Domeneix BA (1992) *Mol Endocrinol* **6**: 1797-1804
99. Nagaya T, Murata Y, Yamagushi S, Nomura Y, Ohimori S, Fujieda M, Katunuma N, Yen PM, Chin WW, Seo H (1998) *J Biol Chem* **273**: 33166-33173
100. Denver RJ, Ouellet L, Furling D, Kobayashi A, Fujii-Kuriyama Y, Puymirat J (1999) *J Biol Chem* **274**: 23128-23134
101. Bellandia B, Latasa MJ, Villa A, Pascual A (1998) *J Biol Chem* **273**: 3036- 30371
102. Decaux JF, Juanes M, Bossard P, Girard J (1997) *Mol Cell Endocrinol* **130**: 61-67
103. Park EA, Song S, Olive M, Roesler WJ (1997) *Biochem J* **322**: 343-349
104. Radoja N, Diaz DV, Minars TJ, Freedberg JM, Blumenberg M, Tomic-Canic M (1997) *J Invest Dermatol* **109**: 566-572
105. Perin MC Blanchet JP, Mouchiroud G (1997) *Hematol Cell Ther* **39**: 19-26

Heterodimeryczne receptory jądrowe. II. Regulacja przemiany kwasów tłuszczowych i steroidów

Heterodimeric nuclear receptors. II. Fatty acid and steroid metabolism regulation

JANINA KWIATKOWSKA-KORCZAK[1], DANUTA KWIATKOWSKA[2]

Spis treści:

Contents:

Wykaz stosowanych skrótów: BABP — białko wiążące kwasy żółciowe; CAR — konstytutywny receptor androstanu; CYP — cytochrom P450; DR — proste powtórzenie oligonukleotydu w HRE; FATP — błonowe białko transportujące kwasy tłuszczowe; FXR — receptor farnezoidów X; 8-HETE — kwas 8-hydroksyejkozatetraenowy; 15-HETE — kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy; HNF-4-wątrobowy receptor jądrowy-4; HRE — element odpowiedzi hormonalnej, region DNA wiążący receptor; LBD — domena receptora wiążąca ligand, domena E; PPAR — receptor aktywowany przez czynniki proliferacji peroksysomów; PGC-1 — koaktywator PPARγ; PXR — receptor pregnanu X; RXR — receptor kwasu 9-*cis*-retinowego.

I. Wstęp

Nie ma potrzeby przekonywać czytelnika, jak istotne znaczenie dla funkcjonowania organizmu ma właściwa regulacja przemiany lipidów. Wszelkie jej zaburzenia upośledzają wiele procesów życiowych. Rola hormonów przysadki, glukagonu, a zwłaszcza insuliny w tej regulacji jest dobrze znana, choć i tu stale odkrywa się nowe fakty. Obecnie okazuje się, że przemiana lipidów jest regulowana także przez ligandy receptorów jądrowych, które kontrolują transkrypcję genów wielu białek transportowych oraz enzymów tego metabolizmu. Receptory te należą do rodziny heterodimerycznych czynników transkrypcyjnych. Cechuje je homologia strukturalna, zdolność tworzenia dimeru z RXR, receptorem kwasu 9-*cis*-retinowego (*retinoid X receptor*) oraz powinowactwo do wspólnego HRE, regionu rozpoznania w DNA, (*hormone responsive element*). W przypadku heterodimerycznych receptorów, występujących u ssaków, region ten stanowią dwie sekwencje AGGCTA, zwane półmiejscami, oddzielone od siebie o kilka nukleotydów. Liczba tych ostatnich stanowi o swoistości wiązania receptora z HRE. Przeważnie jest ich od jednego do pięciu, zgodnie z regułą 1-5. Obie sekwencje AGGCTA są ułożone jako proste powtórzenie, DR (*direct repeat*), lub palindromowo, IR (*inverted repeat*). Każde półmiejsce łączy się z monomerem receptora. [1-5]. Najwcześniej opisano i najlepiej poznano heterodimeryczne receptory retinoidów, witaminy D_3 i hormonów tarczycy. Opisano je w I części tego artykułu.

Z czasem poznano znacznie więcej przedstawicieli tej rodziny. Jak się okazało, co najmniej kilka z nich uczestniczy w regulacji przemiany lipidów.

II. Receptory sieroce

Białka zlokalizowane w jądrze komórkowym, pełniące funkcję czynników transkrypcyjnych, których ligandów na razie nie znamy, nazywamy recep-

[1]Prof. dr hab., [2]dr hab. Zakład Biochemii Lekarskiej AM, ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

torami sierocymi. Mają one zdolność aktywacji lub represji transkrypcji genów i/lub wiązania znanych HRE w regulatorowych regionach DNA. Dotychczas opisano ponad 80 takich białek, z tego 40 — w tkankach ludzkich. Powstała koncepcja „odwrotnej endokrynologii", która, inaczej niż klasyczna, kończy się, a nie zaczyna odnalezieniem hormonu, lub innego liganda, wiążącego się ze znanym receptorem [3]. W przypadku receptorów heterodimerycznych, dodatkowym kryterium rozpoznawczym jest zdolność asocjacji z RXR, który jest stałym partnerem w tych dimerach, oraz wiązania się z charakterystycznym regionem DNA zgodnie z regułą 1-5 [4, 5].

Wszystkie dotychczas opisane heterodimeryczne receptory sieroce spełniają oba kryteria. W miarę poznawania ich ligandów okazało się, że podobnie jak w przypadku znanych już receptorów witamin i hormonów , ligandy te są wysoce zróżnicowane pod względem budowy chemicznej. Są to przeważnie substancje lipofilne. Są wśród nich zarówno wewnątrzkomórkowe metabolity, jak i hormony, prostaglandyny i egzogenne ksenobiotyki. Do grupy heterodimerycznych receptorów zalicza się także białka jądrowe, różniące się niektórymi właściwościami od typowych przedstawicieli tej rodziny. Niektóre, takie jak COUP, HNF-4 i GCNF wykazują aktywność transkrypcyjną nie tylko w połączeniu z RXR, ale także jako homodimery, choć zazwyczaj ta aktywność jest wtedy słabsza. Inne, jak np. CAR (*constitutive androstane receptor*) mają swoiste ligandy, ale są aktywne w ich nieobecności. Są dane wskazujące, że w tych przypadkach ligand pełni funkcje inhibitora ekspresji docelowego genu [4].

Do sukcesów „odwrotnej endokrynologii" zalicza się odkrycie działania kilku receptorów sierocych, regulujących przemianę kwasów tłuszczowych i ich pochodnych oraz steroidów. Są to: PPAR *(peroxisome proliferator-activated receptor)*, FXR (*farnesoid X receptor*), LXR (*liver X receptor*), PXR (*pregnane X receptor*) i CAR (*constitutive androstane receptor*).

III. PPAR, receptory aktywowane przez czynniki proliferacji peroksysomów

Czynnikami proliferacji peroksysomów nazwano heterogenną grupę substancji, które zwiększają liczbę tych organelli w komórkach i stymulują gospodarkę lipidów, a zwłaszcza ich usuwanie z osocza. Należą tu ksenobiotyki, tzw. fibraty (fenoksyizomaślany), obniżające poziom triglicerydów w osoczu oraz tiazolidenodionowe leki przeciwcukrzycowe. Wkrótce okazało się, że leki te wiążą się z receptorem jądrowym, nazwanym PPAR, który tworzy dimer z RXR i rozpoznaje HRE typu DR-1[6].

PPAR występuje w postaci trzech izoform: $PPAR_{\alpha}$, $PPAR_{\chi}$ i $PPAR_{\beta/\delta}$.

Formy te różnią się lokalizacją, powinowactwem do niektórych ligandów oraz odpowiedziami komórkowymi. $PPAR_{\alpha}$ występuje głównie w wątrobie, a także w nerkach i mięśniach, $PPAR_{\chi}$ w adipocytach, jelitach i monocytach, $PPAR_{\beta/\delta}$ — we wszystkich tkankach, ale najmniej jest go w wątrobie.

Naturalnymi ligandami wszystkich form PPAR są kwasy tłuszczowe, zwłaszcza nienasycone, jak oleinowy, linolenowy i arachidonowy. Stałe ich wiązania (80-100 nm) mieszczą się w zakresie fizjologicznych stężeń tych kwasów. Domeny E w $PPAR_{\alpha}$ i $PPAR_{\beta/\delta}$ mają trzykrotnie większe kieszonki wiążące ligand, niż inne receptory, co umożliwia wiązanie dużych cząsteczek. Duże powinowactwo względem PPAR ma także roślinny kwas fitanowy [7]. Oprócz kwasów tłuszczowych, poszczególne formy PPAR wiążą też selektywnie pewne ligandy. $PPAR_{\alpha}$ wiąże hydroksylowe pochodne kwasu eikozatetraenowego — leukotrieny 8-HETE i 15-HETE oraz fibraty, zaś $PPAR_{\chi}$ — prostaglandynę PGJ_2 i leki typu rezuliny. Przypuszcza się, że PPAR może pełnić rolę sensora lipidów, i że to one, a nie jakiś hipotetyczny hormon są fizjologicznymi ligandami tych receptorów [3, 4, 7].

$PPAR_{\alpha}$ indukuje syntezę enzymów przemiany lipidów w różnych strukturach subkomórkowych: w peroksysomach — dwufunkcyjnej oksydazy acylo-CoA/tiolazy 3-ketoacylo-CoA oraz enzymów przemiany rozgałęzionych kwasów tłuszczowych; w mikrosomach — cytochromu P450-4-1 i enzymów ω-oksydacji; w mitochondriach — karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, enzymu jabłczanowego i dehydrogenazy acylo-CoA [6, 7]. PPAR kontrolują ekspresję genu FATP (*fatty acid transporter protein*), błonowego transportera kwasów tłuszczowych: $PPAR_{\alpha}$ — w wątrobie, a $PPAR_{\chi}$ — w tkance tłuszczowej. W regulatorowym regionie genu FATP znajduje się element odpowiedzi na PPAR [8]. $PPAR_{\alpha}$ ma też udział w kontroli pozakomórkowego transportu lipidów, zarówno triglicerydów i kwasów tłuszczowych, jak i cholesterolu. Wcześniejsze obserwacje o wpływie fibratów na obniżenie stężenia lipidów w osoczu znalazły potwierdzenie w doświadczeniach na myszach pozbawionych genu $PPAR_{\alpha}$. Poziom cholesterolu całkowitego, HDL-cholesterolu i triglicerydów był u nich znacznie wyższy, niż u dzikiego szczepu. U zwierząt tych obserwowano też wzmożoną ekspresję genów apolipoprotein A-1, A-2 i C-III [9]. Wszystkie formy PPAR indukują tran-

skrypcję genu cyklooksygenazy-2. Promotor tego genu zawiera HRE typu DR-1 [10].

$PPAR_\chi$ odgrywa rolę w różnicowaniu preadipocytów. Pojawia się już we wczesnych okresach rozwoju komórek tłuszczowych. Wprowadzony do fibroblastów indukuje ich różnicowanie do adipocytów. Stymuluje też różnicowanie monocytów i makrofagów. W monocytach ligandy $PPAR_\chi$ hamują za jego pośrednictwem syntezę cytokin, uczestniczących w procesach zapalnych [11]. $PPAR_\chi$ ma silny wpływ na przemianę lipidów: leki typu rezuliny, które wiążą się z nim wybiórczo, powodują obniżenie zawartości i transportu lipidów w osoczu, co pośrednio wpływa też na stężenie glukozy [12]. $PPAR_\chi$ występuje w dwu podtypach, 1 i 2. Aktywatory podtypu-1 pobudzają syntezę podtypu-2, a także białka C/EBP_α, które reguluje różnicowanie komórek. Obserwowano, że pociąga to za sobą hamowanie cyklu komórkowego i wzrostu kilku linii komórek prawidłowych i nowotworowych [13].

Ostatnie badania przyniosły informacje o odkryciu swoistego koaktywatora $PPAR_\chi$, PGC-1 (PPAR *coactivator-1*). Receptor aktywowany przez ligand łączy się z PGC-1. Następuje zmiana konformacji koaktywatora, umożliwiająca jego interakcję z wieloskładnikowym kompleksem białkowym. Kompleks ten asocjuje ze składnikami układu polimerazy II i inicjuje transkrypcję docelowego genu [14].

Najmniej wiadomo dotychczas o działaniu $PPAR_{\beta/\delta}$, znanego też pod nazwą $PPAR_\delta$ lub NUC-1. Forma ta jest silnie aktywowana przez kwasy tłuszczowe o długim łańcuchu. Stwierdzono, że ekspresja genu tej formy receptora zachodzi bardzo aktywnie w początkowym stadium różnicowania adipocytów. Aktywacja $PPAR_\delta$ nie wystarcza jednak dla indukcji późniejszych i końcowych etapów tego procesu, w których niezbędny jest udział $PPAR_\chi$. $PPAR_\delta$ indukuje transkrypcję genu $PPAR_\chi$, a więc sprzyja przebiegowi dalszych faz różnicowania. Stymuluje też ekspresję genu FATP oraz białka wiążącego lipidy w adipocytach.

Wszystkie trzy formy PPAR uczestniczą w procesie indukcji proliferacji peroksysomów i enzymów β-oksydacji w brązowej tkance tłuszczowej w czasie jej aklimatyzacji do obniżonej temperatury [15].

Synteza PPAR jest regulowana hormonalnie. Glukokortykoidy indukują ekspresję genów PPAR, zaś insulina i hormon wzrostu— hamują ją. Hormony płciowe też modulują działanie PPAR, gdyż u samic szczurów odpowiedź komórkowa na aktywatory PPAR jest znacznie słabsza, niż u samców. Negatywny wpływ hormonów tarczycy na efekty PPAR można tłumaczyć konkurencją o wiązanie RXR, co uniemożliwia powstanie aktywnego heterodimeru PPAR/RXR [16].

IV. LXR, wątrobowy receptor X

LXR występuje w dwóch formach: LXR_α i LXR_β. Obydwie znaleziono w wątrobie , a LXR_β — ponadto w innych tkankach, a zwłaszcza w mózgu. Naturalnymi ligandami LXR są oksosterole: 24,25-epoksycholesterol oraz 24-hydroksycholesterol. Ten pierwszy obficie występuje w wątrobie i przypuszczalnie jest głównym aktywatorem LXR_α. Wysokie stężenie 24-hydroksycholesterolu w mózgu sugeruje, że jest on fizjologicznym ligandem LXR_β [17].

Stwierdzono, że w hepatocytach HRE dimeru LXR/RXR znajduje się w promotorze genu hydroksylazy 7α-cholesterolowej (CYP7A). Enzym ten katalizuje pierwszy, ograniczający etap szlaku syntezy kwasów żółciowych. Można sądzić, że aktywacja tego enzymu przez oksysterol jest częścią mechanizmu, zwiększającego wydalanie cholesterolu [3, 18]. Wiadomo, że oksysterole hamują też syntezę cholesterolu, gdyż są represorami genu reduktazy HMG-CoA, przy czym działają skuteczniej niż cholesterol. Ich udział w syntezie kwasów żółciowych i wydalaniu cholesterolu sugeruje, że związki te pełnią centralną rolę w homeostazie cholesterolu w organizmie.

Fizjologiczna rola LXR w tkankach pozawątrobowych, ani jego geny docelowe nie są na razie znane.

V. FXR, receptor farnezoidów X

FXR znajduje się w wątrobie, nerkach, jelitach i nadnerczach ssaków. Wydaje się, że nazwa tego receptora nie oddaje jego roli. Nazwano go tak, gdy odkryto, że może wiązać farnezoidy w tkankach myszy. Okazało się jednak, że u innych zwierząt FXR nie ma powinowactwa do farnezoidów, a i u myszy wymaga wysokich, niefizjologicznych stężeń tych związków. Naturalnymi aktywatorami u zwierząt i ludzi okazały się kwasy deoksyżółciowe. Szczególnie aktywny jest kwas chenodeoksycholowy. Deoksycholan oraz litocholan wiążą się z FXR i działają w słabszym stopniu, natomiast kwas cholowy jest całkowicie pozbawiony aktywności [19]. Stwierdzono, że wiązanie liganda indukuje zmianę konformacji receptora, jego asocjację z RXR oraz wydatne zwiększenie powinowactwa do koaktywatorów transkrypcji, m.in. białka SRC-1 [20]. Dimer FXR/RXR wiąże się z HRE typu IR-1 (*inverted repeat-1*, →n←). Reguluje ekspresję dwu genów, odgrywających ważną rolę w przemianie kwasów żółciowych. Stwierdzono, że

FXR aktywuje ekspresję genu białka przenoszącego kwasy żółciowe z jelit do wątroby, BABP (*bile acid binding protein*), hamuje zaś gen hydroksylazy 7α-cholesterolowej (CYP7A). Niesprzężone kwasy żółciowe aktywują FXR we wszystkich tkankach, natomiast sprzężone z glicyna lub tauryną — tylko w tych, w których zachodzi synteza BABP [21].

Tak oto przemiana kwasów żółciowych jest regulowana przez co najmniej dwa receptory jądrowe: LXR, aktywowany przez oksysteroidy pobudza syntezę poprzez indukcję CYP7A, zaś FXR, aktywowany przez kwasy deoksyżółciowe, hamuje ten proces na drodze sprzężenia zwrotnego, jednocześnie zaś pobudza transport jelitowo-wątrobowy.

VI. PXR, receptor pregnanu X

Odkrycie PXR rzuciło światło na mechanizmy indukcji cytochromów P450 przez nieswoiste ksenobiotyki. Okazało się, że wiele związków chemicznych łączy się z PXR, aktywując powstanie jego dimeru z RXR i asocjację z HRE, mieszczącym się w promotorze genu hydroksylazy CYP3A4, a w rezultacie — ekspresję tego genu. Hydroksylaza CYP3A4 katalizuje utlenienie i inaktywację co najmniej połowy znanych ksenobiotyków, indukujących syntezę tego enzymu, w tym antybiotyków, leków przeciwgrzybiczych, glukokortykoidów, inhibitorów reduktazy HMG-CoA i innych. PXR występuje w tkankach, w których zachodzi synteza hydroksylazy CYP3A4, tzn. w wątrobie i jelitach [22].

Aktywatorami PXR okazały się też endogenne steroidy: pregnany, estrogeny, kortykosteroidy i ich metabolity. Szczególną aktywnością odznacza się pochodna progesteronu, 5β-pregnano-3,20-dion. Wszystkie steroidy wiążą sie z PXR w stężeniach nieco wyższych niż fizjologiczne. Być może PXR i indukowana z jego udziałem hydroksylaza CYP3A4 biorą udział w katabolizmie steroidów i usuwaniu ich nadmiaru [3].

VII. Receptory o konstytutywnej aktywności

Wykryto istnienie grupy receptorów sierocych, które okazują aktywność transaktywacyjną w nieobecności ligandów. Należą do nich mało dotychczas poznane COUP, HNF4, MB67 i inne. Niektóre z nich mogą tworzyć zarówno heterodimery z RXR, jak i homodimery. Na przykład HNF4 (*hepatocyte nuclear factor-4*) wiąże się w postaci homodimeru z HRE typu DR-1 i wykazuje silne działanie transaktywacyjne. Grupa receptorów COUP-1, COUP-2 i COUP-3, (znanych też po nazwą EAR2, EAR3 i ARP1) działa jako dominujący represor podstawowego poziomu transkrypcji, a także transaktywacji genów, indukowanej przez RAR, VDR i TR. Wykazano to w doświadczeniach z użyciem transfekowanych komórek, w których gen lucyferazy sprzęgano z promotorem, zawierającym HRE dla tych receptorów. COUP mają silne powinowactwo do RXR, więc niektórzy autorzy przypuszczają, że hamowanie transaktywacji wywoływanej przez heterodimery polega na konkurencji o miejsce wiążące w RXR [4].

Z tkanek myszy izolowano CAR, konstytutywny receptor androstanów. W wyniku alternatywnego składania mysiego genu *mcar* powstają dwie formy: CAR1 (CAR_{β}) jest aktywny, zaś CAR2, pozbawiony C-końcowej domeny nie wykazuje aktywności transaktywacyjnej. CAR1 jest spokrewniony z ludzkim MB67(hCAR). CAR1 wiąże się z RXR i jako heterodimer rozpoznaje HRE typu DR-5 [23].

CAR_{β} występuje w znacznych ilościach w wątrobie. Poszukiwanie jego naturalnych ligandów doprowadziło do odkrycia, że wiąże się on wybiórczo z androstanolem i androstenolem. Androstan, dihydroandrosteron i testosteron są całkowicie pozbawione aktywności, wykazują ją bowiem jedynie 3α-hydroksy pochodne androstanu, zredukowane w pozycji 5. Przyłączenie liganda nie obniża zdolności dimeryzacji receptora z RXR, ani wiązania dimeru z HRE, natomiast hamuje transaktywację, wykazywaną przez wolny heterodimer. W przypadku innych znanych receptorów jądrowych, przyłączenie liganda powoduje zmianę konformacji regionu AF-2, umożliwiając interakcję receptora z koaktywatorami transkrypcji. Autorzy postulują, że w CAR region ten przybiera aktywną konformację w nieobecności liganda, zaś przyłączenie tego ostatniego powoduje utratę powinowactwa do koaktywatora. Jak się więc wydaje, zadaniem liganda jest hamowanie konstytutywnej transaktywacji genów docelowych przez dimer CAR/RXR [24]. Nie jest wykluczone, że taki mechanizm działania ma też miejsce w przypadku innych receptorów konstytutywnych, jednak nieznajomość ich ligandów pozostawia taki wniosek w sferze domysłów.

Ostatnio odkryto jeden z genów regulowanych przez CAR_{β}. Koduje on hydroksylazę steroidową CYP2B, uczestniczącą w homeostazie hormonów steroidowych. Hamowanie jej syntezy przez pochodne androstanu może stanowić jeden z mechanizmów regulacji przemiany tych hormonów [1]. CAR aktywuje też promotor genu receptora kwasu retinowego, $RAR_{\beta 2}$. Jak wiadomo, głównym induktorem RAR jest kwas retinowy. Być może rola CAR polega na utrzymywaniu podstawowego poziomu ekspresji

genu jednego z typów RAR, niezależnie od obecności RA w komórce [23].

VIII. Uwagi końcowe

Odkrycie ligandów opisanej grupy heterodimerycznych receptorów jądrowych (już nie) sierocych, pozwala na lepsze zrozumienie regulacji przemiany lipidów. Odbywa się ona na poziomie transkrypcji genów wielu enzymów i innych białek, uczestniczących w metabolizmie kwasów tłuszczowych, triglicerydów i steroidów. Aktywatorami opisanych receptorów są m.in. endogenne substraty i metabolity, co umożliwia regulację typu sprzężenia zwrotnego, zaś ligandy mogą pełnić funkcję czujników metabolicznych.

Otwierają się nowe perspektywy leczenia zaburzeń przemiany lipidów. Szczególną uwagę badaczy przyciąga ostatnio PPAR, ze względu na to, że jego ligandami są leki. Uczestniczy on w różnicowaniu adipocytów i innych komórek oraz w procesach zapalnych. Zapewne niedługo PPAR będzie wymagać osobnego omówienia.

Wyjaśniają się też mechanizmy regulacji hydroksylaz, związanych z cytochromem p450, w tym także enzymów indukowanych przez ksenobiotyki.

Należy oczekiwać, że odkrycie ligandów innych heterodimerycznych receptorów sierocych przyniesie równie interesujące informacje.

Artykuł otrzymano 27 stycznia 2000 r.
Zaakceptowano do druku 13 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) *Cell* **83**: 841-850
2. Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) Cell 83: 859-869
3. Kliever SA, Lehmann JM, Willson TM (1999) *Science* **284**: 757-760
4. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM (1990) *Nature* **345**: 224-229.
5. Kwiatkowska D, Kwiatkowska-Korczak J (1999) *Post Biol Kom* **26**: 579-592
6. Costet P, Legendre Ch, More J, Edgar A, Galtier P (1998) *J Biol Chem* **273**: 29577-29585
7. Ellinghaus P, Wolfrum BI, Assman G, Spener F, Seedorf U (1999) *J Biol Chem* **274**: 2766-2772
8. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA (1999) *J Biol Chem* **274**: 3970-3977
9. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart J-C, Fievet C, Gonzales FJ, Auwerx J (1997) *J Biol Chem* **272**: 27307-27312
10. Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999) *J Biol Chem* **274**: 8328-8334
11. Jiang CH, Ting AT, Seed B (1998) Nature 391: 82-86
12. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Willson TM, Kliever SA (1995) *J Biol Chem* **270**: 12953-12956
13. Hansen JB, Petersen RK, Larsen BM, Bartkova J, Alsner J, Kristiansen K (1999) *J Biol Chem* **274**: 2386-2393
14. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelmen BM (1999) *Science* **286**: 1368-1371
15. Guardiola-Diaz HM, Rehnmark S, Usuda N, Albreksten T, Feltkamp D, Gustafsson JA, Alexson EH (1999) *J Biol Chem* **274**: 23368-23377
16. Zhou Y-Ch, Waxman DJ (1999) *J Biol Chem* **274**: 2672-2681
17. Teboul M, Enmark E, Li O, Wilkstrom AC, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2096-2100
18. Lehmann JM, Kliever SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su J-L, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997) *J Biol Chem* **272**: 3137-3140
19. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliever SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999) *Science* **284**: 1365-1368
20. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999) *Science* **284**: 1362-1365
21. Gustafsson J-A (1999) *Science* **284**: 1285-1286
22. Maurel P (1996) w: Joannides C (red) *Cytochromes P450. Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton str 241-270
23. Choi H-S, Chung M, Tzameli I, Simha D, Lee YK, Seol W, Moore DD (1997) *J Biol Chem* **272**: 23565-23571
24. Forman BM, Tzameli I, Choi H-S, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD (1998) *Nature* **395**: 612-615

Geny syntaz tlenku azotu: struktura, regulacja ekspresji, produkty białkowe

Genes of nitric oxide synthases: structure, regulation of expression, protein products

NATALIA DEREBECKA[1], MARCIN HOŁYSZ[2], WIESŁAW H. TRZECIAK[3]

Spis treści:

Contents:

Stosowane skróty: BH_4 — tetrahydrobiopteryna; CaM — kalmodulina; m.cz. — masa cząsteczkowa; kD — 1000 daltonów; kpz — 1000 par zasad; NOS1 — neuronalna syntaza tlenku azotu; NOS2 — indukowalna syntaza tlenku azotu; NOS3 — endotelialna syntaza tlenku azotu; nt — nukleotydy; pz — pary zasad; poz. — pozycja; M — zasada A lub C; N — dowolna zasada; R — zasada A lub G; S — zasada C lub G; W — zasada A lub T; Y — zasada T lub C. 3'UTR — region 3' transkryptu nie ulegający translacji, 5'UTR — region 5' transkryptu nie ulegający translacji.

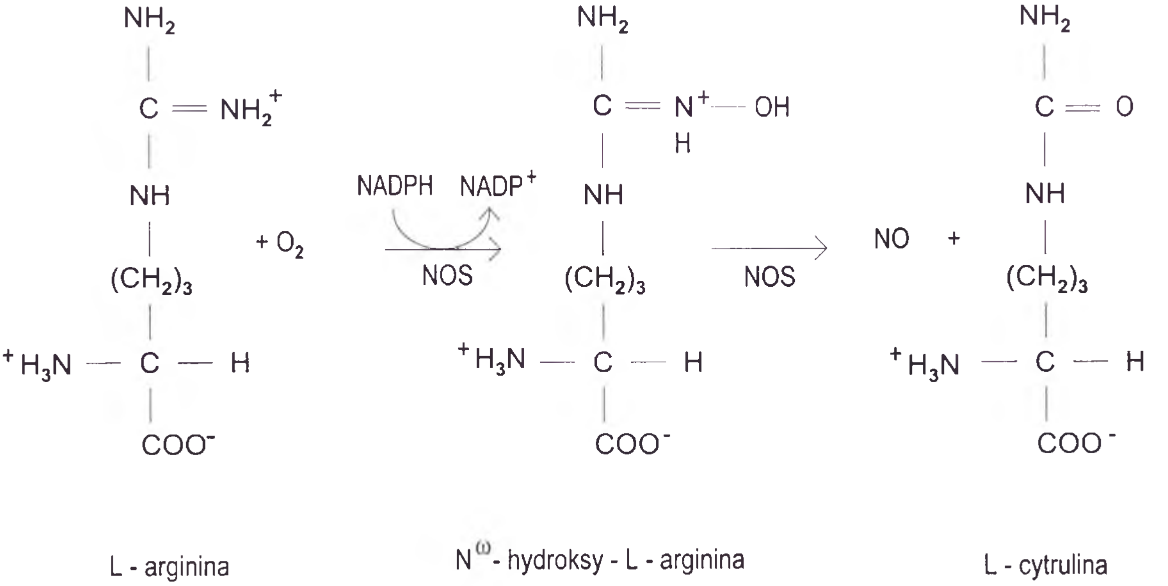
I. Wstęp

Tlenek azotu jest nietrwałym gazem, o okresie półtrwania ($t_{1/2}$) rzędu kilku sekund. Ma on charakter wolnego rodnika, reaguje więc szybko z cząsteczkami zawierającymi niesparowany elektron [1, 2]. Tlenek azotu powstaje w wyniku dwóch reakcji, w których reszta guanidynowa L-argininy ulega pięcioelektronowemu utlenieniu. Produktami są tlenek azotu (NO) i cytrulina (Ryc.1) [3-11]. Reakcje te są katalizowane przez syntazę tlenku azotu (NOS) [12, 13]. Do tej pory zidentyfikowano trzy izoformy ludzkiej NOS: neuronalną (NOS1), indukowalną (NOS2) i endotelialną (NOS3). Wszystkie izoformy zawierają żelazo hemowe oraz domeny wiążące FAD, FMN, tetrahydrobiopterynę (BH_4), kalmodulinę (CaM) i NADPH [3, 7, 8, 11, 13-17]. Mimo to homologia sekwencji aminokwasów trzech izoform nie przekracza 60% [7, 18, 19]. We wszystkich izoformach stwierdza się miejsca potencjalnej fosforylacji przez kinazy białkowe [19, 20].

W 1980 r. Furchgott i Zawadzki prowadząc badania nad wpływem acetylocholiny na naczynia krwionośne, odkryli nieznany dotąd czynnik uwalniany pod wpływem acetylocholiny przez komórki śródbłonka, nazwany śródbłonkowym czynnikiem rozkurczającym (*endothelium-derived relaxing factor*, *EDRF*) [21]. W 1987 r. Ignarro wykazał, iż EDRF to tlenek azotu [22, 23]. W tym samym roku potwierdził to Moncada [24]. Zanim poznano fizjologiczną rolę NO w organizmie, wiadomo już było dzięki pracom Murada, że jest on uwalniany z nitrogliceryny i innych azotanów. Wykazano, że

[1]Studentka (magistrantka), [2]student (magistrant), [3]prof. dr hab., Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

NO odpowiada za ich efekty farmakologiczne, które okazały się zależne od aktywacji cytosolowej cyklazy guanylanowej katalizującej reakcję przemiany



Ryc. 1. Przebieg reakcji biosyntezy tlenku azotu

GTP w cykliczny GMP (cGMP) [25-27]. W 1998 r. Furchgottowi, Ignarro oraz Muradowi przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za odkrycie roli tlenku azotu jako cząsteczki sygnałowej w organizmie [1, 28]. Tlenek azotu odgrywa rolę cząsteczki sygnałowej w układzie krążenia, ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz w układzie immunologicznym [1, 3, 5, 29, 30]. Nieprawidłowości jego syntezy mogą wywoływać miażdżycę tętnic, chorobę niedokrwienną serca, nadciśnienie tętnicze, choroby układu nerwowego i nowotwory oraz pozostają w związku z infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi, cukrzycą, patologią ciąży i in. [3, 5, 31].

W układzie krążenia NO obniża napięcie mięśniówki gładkiej ścian naczyń krwionośnych i utrzymuje prawidłowe ciśnienie krwi. Za stałe uwalnianie NO odpowiedzialne jest oddziaływanie przepływającej krwi na śródbłonek i aktywacja kanałów K^+ (tzw. *shear stress)* [5, 32, 33]. Współdziałając z prostacykliną PGI2, uwalnianą z endotelium [9, 34], NO zapobiega rozwojowi blaszki miażdżycowej hamując agregację płytek krwi oraz uwalnianie z nich tromboksanu, serotoniny, czynnika aktywującego płytki (PAF) i czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF) [1, 3, 4, 25, 35-37].

W polskim piśmiennictwie pojawiły się publikacje traktujące o roli NO w organizmie [1, 3, 5, 29], jednak w żadnej z nich nie znaleźliśmy szerszych informacji na temat struktury genów syntaz tlenku azotu i regulacji ich ekspresji.

Celem pracy jest omówienie i przedyskutowanie najnowszych badań poświęconych strukturze i transkrypcji genów syntaz tlenku azotu, ze szczególnym uwzględnieniem *Nos3*. W pracy pominięto szczegółowe rozważania dotyczące transkrypcji genów *Nos1* i *Nos2* oraz mechanizmu działania NO w poszczególnych tkankach, a także efektów biologicznych związanych z jego powstawaniem, ponieważ kwestie te zostały omówione we wcześniejszych opracowaniach.

II. Struktura genów syntaz tlenku azotu

Znana jest struktura cDNA i genów trzech izoform ludzkiej syntazy tlenku azotu (Tab. 1). Geny te mają zbliżoną liczbę eksonów: gen *Nos1*-29, a geny *Nos2* i *Nos3* po 26 eksonów. Wielkość genu *Nos1* wynosi ok. 160 kpz, a eksony mają długość od 59 do 2150 pz [38]. Gen *Nos2* obejmuje ok. 37 kpz, a wielkość eksonów wynosi od 50 do 586 pz [39]. Gen *Nos3* ma wielkość około 21 kpz, a eksony mają długość od 68 do 580 pz [19, 40] (Tab. 3). Lokalizacji genów *Nos* dokonano dzięki zastosowaniu metody FISH, w której komórki hybrydowe, człowieka i gryzonia poddano hybrydyzacji z sondą znakowaną fluorescencyjnie. Stwierdzono, że gen każdej z izoform zlokalizowany jest na innym chromosomie: *Nos1* na 12, *Nos2* na 17, a *Nos3* na 7 [6, 7, 41].

II-1. Regiony regulatorowe genów *Nos*

II-1-1. *Nos1*

Po stronie 5' genu *Nos1* znaleziono sekwencję TATA (*TATA-box)*, umiejscowioną w poz. -28 [38].

Do sekwencji tej przyłącza się czynnik TBP (*TATA-box binding protein*), o masie cząsteczkowej ok. 30 kD, który tworzy, wraz z sekwencją TATA, pod-

promotorze genu stwierdza się także miejsce wiązania czynnika AP1 oraz siedem miejsc wiązania czynnika AP2. Promotor tego genu zawiera również se-

Tabela 1.

Geny syntaz tlenku azotu

Izoforma	**nos 1**	**nos 2**	**nos 3**
Lokalizacja na chromosomie	12q24,2	17qcen-q12	7q35-36
Liczba eksonów	29	26	26
Długość eksonów	59-2150 pz	51-586 pz	67-579 pz
Długość intronów	25 - 0,3 kpz	6 - 0,1 kpz	4 – 0,1 kpz
Wielkość genu	160 kpz	37 kpz	21 kpz

stawę kompleksu inicjującego transkrypcję. Spośród innych czynników, mających w promotorze genu *Nos1* swoje miejsca wiązania można wymienić: CREB (*cAMP response element binding protein*) w poz. +66, czynnik NFκB (dwie identyczne sekwencje w poz. -316 i -501), czynnik jądrowy 1 (NF1), w poz. -1090, białka Ets w poz. -1116 i -1500, TEF-1/MCBF w poz. -263 i NRF-1 (*nuclear respiratory factor*) w poz. -742. Czynnik transkrypcyjny NFκB, składa się z dwóch podjednostek (65 kD i 50 kD), po odłączeniu ufosforylowanego przez kinazę białkową C inhibitora IκB, którym jest pirolidynoditiokarbaminian (*pyrrolidinedithio carbamate*), przechodzi on do jądra komórkowego , wiąże się z promotorem, a także z sekwencjami znajdującymi się w obrębie wzmacniacza transkrypcji (*enhancer*) [42]. Promotor genu *Nos1* zawiera także dwie odwrócone sekwencje CAAT (ATTG) w poz. -106 i -112 [38].

II-1-2. ***Nos2***

Promotor genu *Nos2* zawiera kasetę TATA umiejscowioną w poz. -30 [39,43]. Kaseta TATA i sekwencje zgodne dla elementów odpowiedzi na interferon gamma (γIRE) znajdują się w poz. -975 i -900 [38, 39, 43- 47]. W fragmencie o długości 425pz po stronie 5' genu znajdują się miejsce wiązania czynnika NFκB [7, 38, 39, 42, 43, 45, 47, 48] i miejsce wiązania aktywatora A odpowiedzialnego za tkankowo-specyficzną ekspresję w wątrobie [39, 43] oraz palindromowy element odpowiedzi na TNFα [39, 43, 49]. Dowiedziono, że czynnik ten uczestniczy także w ekspresji genu *Nos2*, indukowanej przez interleukinę 1β (IL-1β) [42, 46, 49, 50]. Mutacje w miejscu wiązania aktywatora A oraz w regionie wiążącym czynnik NFκB powodują obniżenie aktywności transkrypcyjnej promotora *Nos2* [50]. W

kwencje rozpoznawane przez wiele innych czynników, np. lipopolisacharyd (LPS) [7, 39, 44, 45, 47, 51, 52].

II-1-3. ***Nos3***

Promotor genu *Nos3* nie zawiera kasety TATA, co jest charakterystyczne dla genów ulegających konstytutywnej ekspresji [19, 40, 53-55]. Promotory genów, pozbawione sekwencji TATA, obok głównego miejsca, wykazują istnienie wielu drugorzędnych miejsc startu transkrypcji [19, 56]. Transkrypcja tych genów wymaga krótkiej sekwencji bogatej w pary GC, która jest miejscem wiązania czynnika transkrypcji Sp1 [19, 47, 52-55, 57]. Czynnik Sp1, podobnie jak Sp2, Sp3 i Sp4 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających motyw palców cynkowych. Czynnik ten wykorzystywany jest przez polimerazę II RNA i współpracuje z innymi czynnikami transkrypcji [19, 53, 56, 57]. Dowiedziono, że jest on niezbędny do konstytutywnej ekspresji genu *Nos3*, który w regionie regulatorowym zawiera dwa miejsca wiązania Sp1 w poz. -104 i -1327 [19, 53]. Z promotorem genu *Nos3* łączy się także czynnik Sp3, nie stwierdzono natomiast wiązania czynników Sp2 i Sp4 [19, 53]. W bezpośrednim sąsiedztwie miejsca Sp1 (-104), w poz. -108, znajduje się sekwencja rozpoznawana przez tkankowo-specyficzne czynniki transkrypcji należące do rodziny GATA, posiadające struktury palców cynkowych [19, 53, 57-59]. Region regulatorowy genu *Nos3* zawiera też cztery inne przypuszczalne miejsca GATA w poz.: -230, -555, -610 i -1136 [19, 53, 57-59]. Podobnie jak promotory innych genów, ulegających ekspresji konstytutywnej, promotor genu *Nos3*, w pozycji -290, zawiera kasetę CAAT, z którą wiążą się czynniki transkrypcji NF1 i NF3 [52]. Czynnik NF1, który wiąże się także

w poz. -947 i -1211, jest aktywny w formie ufosforylowanej i jego działanie wywołuje ok. 50-krotne zwiększenie poziomu transkrypcji genu *Nos3* [19, 60]. Działanie NF1 jest związany z odpowiedzią komórek na czynnik wzrostu TGF-β [19, 60, 61]. Dowiedziono, że kasety GC i CAAT wpływają na aktywność transkrypcyjną także wtedy, gdy znajdują się na nici matrycowej [10]. Taki przypadek ma miejsce w regionie regulatorowym genu *Nos3*, w którym oprócz kasety CAAT i sekwencji GC występują: odwrócona sekwencja CCAAT (ATTGG) w poz. -631 oraz kaseta GC w poz. -1327 [19]. Promotor genu *Nos3* zawiera także sekwencję TGACGTCA, zwaną CRE (*cAMP response element*), wiążącą białka CREB i CREM (*cAMP response element modulator*), które mogą być fosforylowane przez kinazę białkową A (PKA). Białka te są aktywne w formie homodimerów i zawierają strukturę zamka leucynowego (*leucine zipper*) [19, 62]. W promotorze genu *Nos3* zlokalizowano także dwa miejsca rozpoznawane przez czynnik AP1 (sekwencja TGASTCA w pozycji -661 i -1530) i dwa miejsca wiązania czynnika AP2 (sekwencja CCCCCMNSSS w pozycji -191 i -1162) [19, 63, 64]. Czynniki AP1 i AP2 (*activator protein*) wiążą się z promotorami i sekwencjami wzmacniającymi transkrypcję [52], są one produktami protoonkogenów *c-fos* i *c-jun*, zawierają struktury zamków leucynowych i występują w formie heterodimerów. Czynnik AP1 odgrywa rolę w indukcji transkrypcji przez onkogenne estry forbolu i reaguje także na zmianę stężenia cAMP w komórce [19, 52, 63, 65]]. Promotor genu *Nos3* zawiera również, w poz. -985, sekwencję GAGACC, element odpowiedzi na *shear stress* [7, 32, 33, 48, 52, 65, 66]. Motyw ten związany jest z aktywacją transkrypcji genu *Nos3* wywołaną naporem krwi na śródbłonek naczyń krwionośnych i aktywacją kanałów potasowych. Dowiedziono bowiem, że antagonista transportu jonów K^+ hamuje indukcję genu *Nos3* wywołaną przez *shear stress* [32]. Proces ten jest niezależny od kinazy białkowej C (PKC), ponieważ jej selektywny inhibitor nie hamuje indukcji genu *Nos3* wywołanej przez *shear stress* [32].

W promotorze genu *Nos3* w poz. -1383, stwierdzono także dwie, sąsiadujące ze sobą sekwencje GTGSGGTG, stanowiące negatywny element odpowiedzi na steroidy [19, 66, 67]. Promotor genu *Nos3* może także wiązać jony metali ciężkich, np. Co (sekwencja TGCRCYC w poz. -899), które hamują ekspresję genu [19, 68, 69].

Z promotorem genu *Nos3* wiąże się również białko p53. Istnieją dowody, że p53 może aktywować [19,70] lub hamować [19, 71] transkrypcję tego genu. Miejsce wiążące (-136), zawiera motyw RRRCWWGYYY [19, 72]. Sądzi się, że wiązanie p53 może mieć związek z zahamowaniem przez NO proliferacji komórek i zapobieganiem replikacji uszkodzonego DNA.

III. Modyfikacje transkryptów genów *Nos*

III-1. *Nos1*

Transkrypcja genu *Nos1* zachodzi w okresie rozwoju układu nerwowego oraz ulega indukcji w wyniku uszkodzenia układu nerwowego [33]. Istnieje co najmniej 8 różnych promotorów inicjujących transkrypcję, z których każdy w innym stopniu ulega tkankowo specyficznej ekspresji [7]. Wykryto sześć różnych izoform transkryptu genu *Nos1* powstałych w wyniku alternatywnego składania [73]. Około 5% transkryptów wykazuje brak dwóch eksonów kodujących aminokwasy w miejscu wiązania CaM, co powoduje utratę właściwości katalitycznych białka [52]. Alternatywny *splicing* pozwala na tworzenie białek o różnych właściwościach i różnej strukturze, np. izoforma NOS1-β zachowuje pełną aktywność enzymatyczną, lecz traci domenę odpowiedzialną za oddziaływanie białko-białko, konieczną do kierowania jej do błony synaptycznej [73]. Zaburzenia składania w wyniku których następuje utrata eksonu 2, mogą wywoływać objawy kliniczne zagrażające życiu [73]. Ciekawe przypadki alternatywnego składania odkryto w gonadzie męskiej [73]. Ekson 1 lub jego wersja 1β łączą się z eksonem 2, z kolei struktura ekson 1-ekson 2 lub ekson 1β-ekson 2 przyłącza się do eksonu 4, lub też ekson 1 może łączyć się bezpośrednio z eksonem 4. Translacja takiego mRNA zaczyna się w eksonie 5.

W gonadzie męskiej zidentyfikowano również mRNA, w którym ekson 2 uległ insercji między eksony 3 i 4 co powodowało, że translacja zaczynała się w eksonie 2. Insercja eksonu 2 powoduje także przesunięcie ramki odczytu i wprowadza przedwczesny kodon stop (TGA). Wśród form „splicingowych" niespecyficznych tkankowo, zaobserwowano delecje eksonów 9 i 10 [38, 47] lub delecję tylko eksonu 10 [38]. Jeżeli wycięciu ulegną eksony 9 i 10, obejmujące 315 nukleotydów kodujących aminokwasy znajdujące się w sąsiedztwie miejsca wiązania CaM, powstałe białko, o m. cz. 149 kD, jest zbudowane z 1329 aminokwasów. Delecja eksonu 10 powoduje ubytek 175 nukleotydów i prowadzi do przesunięcia ramki odczytu i wprowadzenia przedwczesnego kodonu stop. Powstałe białko, o m. cz. 62 kD, składa się zaledwie z 560 aminokwasów [38].

III-2. *Nos2*

Ekspresję genu *Nos2* indukują endotoksyny bakteryjne np. LPS i cytokiny: interferon-γ (INF-γ), IL-1β ,TNF-α i IL-6 [43, 45, 50, 52, 74-77]. Po podaniu LPS następuje indukcja mRNA dla NOS 2, wzrost aktywności syntazy i akumulacja cytruliny w hepatocytach. Jednak po 12 godzinach aktywność enzymu oraz akumulacja cytruliny wracają do normy. Pojawia się tzw. stan refrakcji na LPS, w tym stanie kolejne dawki endotoksyny nie powodują dalszego zwiększenia aktywności NOS [51]. Indukcję *Nos2* wywołują ponadto kwas pikolinowy, a także ozon, promieniowanie UV oraz infekcje bakteryjne [47]. Ekspresja NOS może być także hamowana przez immunomodulatory na poziomie transkrypcji lub potranskrypcyjnie. [52]. W regulacji potranskrypcyjnej uczestniczy IFN-γ, który może stabilizować mRNA, podczas gdy TGF-β destabilizuje mRNA i zmniejsza wydajność jego translacji [52]. Nie jest wykluczone, że ekspresja genu *Nos2* może zachodzić konstytutywnie. Obserwuje się taką ekspresję w niektórych tkankach, np. w siatkówce oka, móżdżku, mięśniach szkieletowych i nerce [47]. Stwierdzono występowanie dwóch izoform transkryptu w siatkówce (4,5 i 4,2 kz), natomiast po jednej w móżdżku (4,5 kz) i w mięśniu szkieletowym (4,2 kz) [78].

Ludzki transkrypt genu *Nos2* ma długi 5'-UTR, zawierający osiem otwartych ramek odczytu (*ORF*), poprzedzających kodon start (AUG) i częściowo nakładających się na siebie [43]. Znaleziono cztery miejsca, w których zachodzi alternatywny *splicing*, w wyniku którego mogą powstawać różne formy mRNA różniące się sekwencją 5'-UTR [76]. Nie wykryto natomiast alternatywnego składania, w 3'-UTR [43].

Stężenie mRNA *Nos2* jest regulowane na poziomie transkrypcji i potranskrypcyjnie, poprzez regulację stabilności mRNA. Zwiększenie stężenia izoform transkryptu genu *Nos2* przez cytokiny może tłumaczyć ich rolę w utrzymywaniu lub w zwiększaniu aktywności NOS2 podczas infekcji lub odpowiedzi zapalnej [76]. Alternatywny *splicing* może służyć jako potranskrypcyjny regulator ekspresji i stanowić ochronę przez cytotoksycznym działaniem nadmiaru NO, szczególnie w tkankach zróżnicowanych np. tkance nerwowej.

III-3. *Nos3*

Gen *Nos3* ulega transkrypcji głównie w śródbłonku naczyń krwionośnych, ale ekspresję stwierdza się również w monocytach i makrofagach, a także w płytkach krwi [1, 57, 79-82]. Chociaż ekspresja genu *Nos3* jest głównie konstytutywna, to w pewnych warunkach może być regulowana jego transkrypcja i stabilność mRNA [83]. Ekspresję genu wzmagają estrogeny oraz *shear stress*, a także TGF-β1 [1, 32, 84]. Natomiast TGF-α zmniejsza ilość produktu białkowego genu, powodując destabilizację mRNA (okres półtrwania maleje wtedy z 48 do 3 godz.) [19, 52, 85-87].

Alternatywny *splicing* może mieć udział w potranskrypcyjnej regulacji produkcji NO.

Produkt transkrypcji genu *Nos3* na końcu 3' nie zawiera typowego dla wielu genów sygnału poliadenylacji. Miejsce poliadenylacji znajduje się 16 nukleotydów w kierunku 3' za sekwencją ACTAAA, przypuszczalnym sygnałem poliadenylacji [19]. Transkrypt zawiera ponadto dwie sekwencje AUUUA, które jak wiadomo destabilizują mRNA i są obecne w kilku labilnych transkryptach innych genów endotelialnych [19, 88]. Jednak pomimo stwierdzenia tych sekwencji transkrypt jest stabilny (okres półtrwania wynosi ok. 24 godz.) [19, 88]. Nie wiadomo dokładnie jakie czynniki zewnętrzne mogą destabilizować ten mRNA. Stwierdzono co prawda, że TNFα obniża stężenie mRNA dla NOS3, efekt ten jest jednak konsekwencją nie tylko destabilizacji mRNA lecz także represji transkrypcji genu *Nos*3 [19, 85-87].

Wiadomo, że poziom ekspresji genu *Nos3* jest ściśle związany ze wzrostem i rozwojem komórek. W komórkach proliferujących stężenie mRNA *Nos3* jest czterokrotnie wyższe w porównaniu do komórek nie dzielących się. Co ciekawe, w obydwu przypadkach nie ma różnicy w poziomie transkrypcji genu *Nos3*, natomiast okres półtrwania transkryptów *Nos3* jest trzykrotnie dłuższy w komórkach proliferujących. Przypuszczalnie w regulacji stabilności mRNA ważną rolę odgrywa sekwencja 43 nt w 3'UTR, do której przyłącza się białko o m. cz. 51 kD. Stwierdzono, że delecja tej sekwencji zwiększa stabilność mRNA dla NOS3. Zauważono również, że w komórkach nieproliferujących białko o m. cz. 51 kD jest znacznie silniej związane z transkryptem genu *Nos3*, co tłumaczy mniejszą jego stabilność w tych komórkach [89].

IV. Produkty białkowe genów *Nos*

Sekwencja aminokwasów ludzkiego białka NOS3 wykazuje 94% homologii z tym samym enzymem u bydła, a ok. 60% homologii z ludzką syntazą NOS1 [7, 18, 19, 87]. Skład aminokwasowy N-końca od-

różnia ją od innych syntaz. NOS3 jest bogata w prolinę i zawiera sekwencje docelowe dla acylotransferaz przeprowadzających mirystylację i palmitylację. Ta syntaza jest zakotwiczona w błonie, podczas gdy pozostałe syntazy znajdują się w cytoplazmie [8, 19, 52, 85-87]. Syntazy endotelialna (NOS3) i neuronalna (NOS1) są zależne od kompleksu Ca^{2+}/kalmodulina, natomiast syntaza indukowalna (NOS2) jest niezależna od Ca^{2+} i kalmoduliny [90-93]. Wszystkie trzy syntazy są homodimerami zawierającymi: hem, FAD, FMN i BH_4 [7, 8]. N-końcowy fragment cząsteczki enzymu zajmuje domena oksygenazowa (oxy), a fragment C-końcowy stanowi domena reduktazowa (red) [90]. Struktury domen i wielkości poszczególnych izoform podano w tabeli 2. Domena oksygenazowa ma zdolność przyłączania L-argininy, zawiera także miejsca wiązania hemu i BH_4 oraz ma możliwość tworzenia kompleksu żelazo-CO [94]. Domena reduktazowa posiada zdolność redukcji cytochromu *c*, zależnej od NADPH. Zawiera miejsca wiązania NADPH, FAD i FMN. Pomiędzy domenami zlokalizowane jest miejsce wiązania kompleksu Ca^{2+}/kalmodulina [90, 95, 96]. Kompleks Ca^{2+}/kalmodulina ułatwia przeniesienie elektronów z domeny reduktazowej na domenę oksygenazową (w obecności Ca^{2+}/CaM aktywność domeny reduktazowej jest dziesięciokrotnie większa niż aktywność tej domeny przy braku Ca^{2+}/CaM) [90, 97]. Wykorzystując system ekspresyjny *baculovirus* można otrzymać oddzielnie obie domeny, które po rekonstytucji dają pełną aktywność enzymatyczną NOS3 [90,94]. Domena oksygenazowa zawiera ok. 0,3 mola BH_4 na mol domeny, podczas gdy domena reduktazowa zawiera po 0,7 mola FAD i FMN na mol tej domeny [90]. W układach rekonstytuowanych maksymalną aktywność NOS3 otrzymuje się po zmieszaniu obu domen w stosunku molowym red:oxy (2:1), a rekonstytuowana NOS2 wykazuje maksymalną aktywność gdy jedna domena reduktazowa przypada na kilka domen oksygenazowych [90]. Aktywność NOS3 jest około dziesięć razy mniejsza niż aktywność NOS1 [90]. Na aktywność NOS wpływają: czynniki regulujące stabilność białka (TGF-β destabilizuje białko i mRNA), chelatory kationów (EDTA), fosforylacja reszt serynowych, dostępność argininy i jej analogów (przy niedoborze argininy i nadmiarze NADPH zamiast NO powstaje ponadtlenek lub wodorotlenek), dostępność tlenu i BH_4 oraz obecność NO (NO hamuje NOS) [4, 52, 69, 90].

Tabela 2.

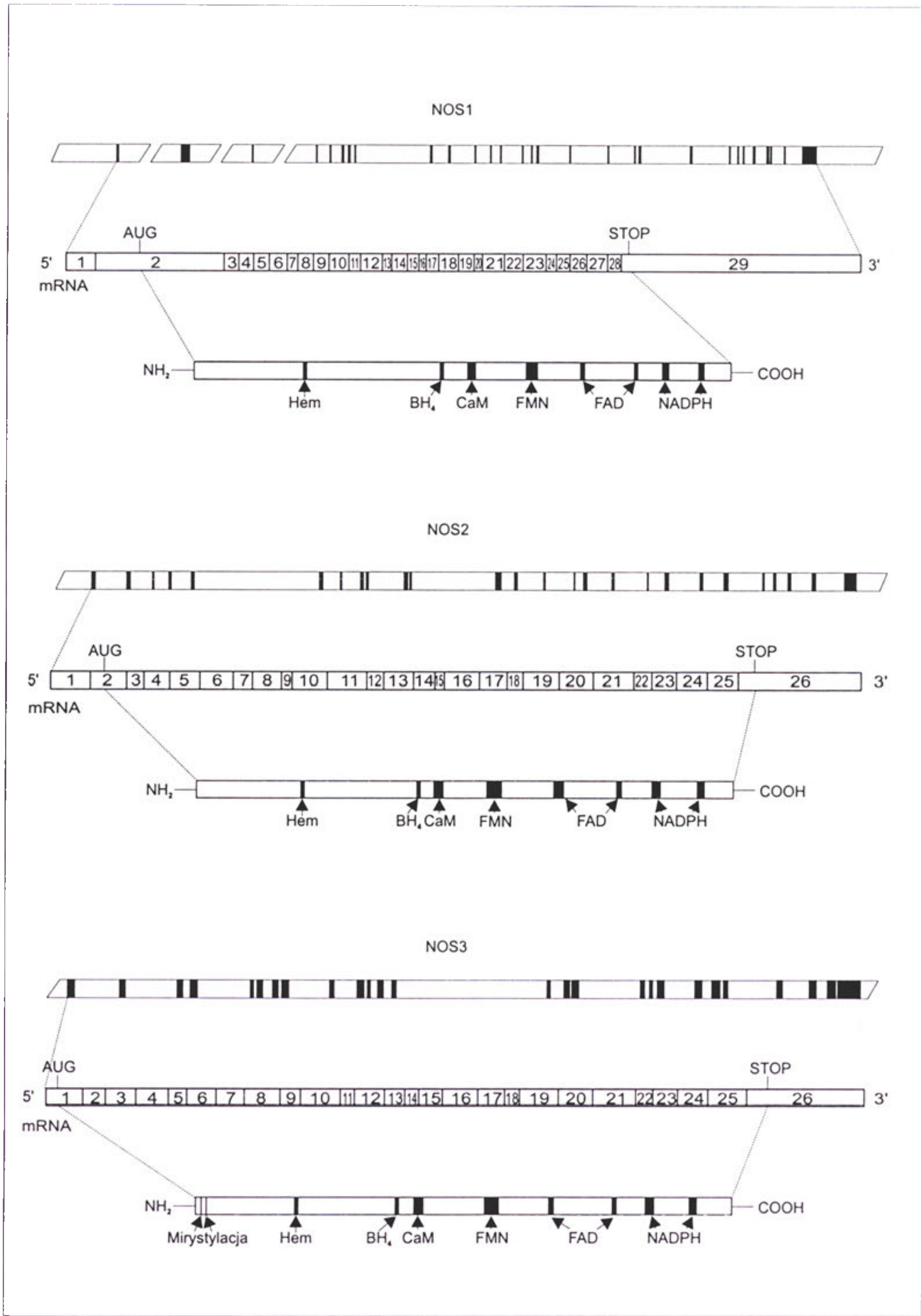
Produkty białkowe genów syntaz tlenku azotu

Izoforma		NOS 1	NOS 2	NOS 3
Masa cząsteczkowa (kD)		161,000	131,000	136,000
Liczba aminokwasów		1434	1153	1203
Domeny	Reduktazowa	C-końcowa , zawiera miejsca wiązania : FMN , FAD i NADPH		
	Oksygenazowa	N-końcowa , zawiera miejsca wiązania : L-argininy , hemu i BH4		
Regulacja aktywności		Ca2+/CaM	niezależna od Ca2+/CaM	Ca2+/CaM
Występowanie w komórkach		cytoplazma		związana z błonami
Główne miejsce działania		układ nerwowy	układ odpornościowy	układ krążenia

V. Uwagi końcowe

Znane są: struktura, lokalizacja, regulacja ekspresji genów, alternatywny *splicing* transkryptów oraz struktura i właściwości produktów białkowych wszystkich trzech izoform syntaz tlenku azotu (Ryc. 2).

Nie wiadomo jednak, czy obserwowane różnice w sekwencji cDNA dotyczące pojedynczych nukleotydów [57] dowodzą istnienia innych alleli genów *Nos*, czy też są one wynikiem np. mutacji punktowych lub redagowania mRNA. Wydaje się też interesujące wyjaśnienie czy allele ludzkiego genu *Nos3* są polimorficzne, gdyż polimorfizm genetyczny mógłby stanowić czynnik ryzyka niektórych chorób, lub też mógłby usprawiedliwiać mniejszą podatność różnych osobników na szkodliwe działanie czynników środowiska [19]. Polimorfizm odkryto w intronach 4 i 13 genu *Nos3* [19, 54, 98, 99]. Nie wyjaśniono jednak czy wpływa on na *splicing* i czy ma związek z chorobami układu krążenia. Ze względu na ważną



Ryc. 2. Schemat struktury genów, mRNA i produktów białkowych genów syntaz tlenku azotu. Zachowano proporcję wielkości eksonów i intronów genów *Nos* oraz eksonów mRNA. Cyframi oznaczono kolejne eksony. W schemacie produktów białkowych zachowano przybliżone proporcje wielkości i lokalizacji miejsc wiążących: hem, tetrahydrobiopterynę (BH_4), kalmodulinę (CaM), FMN, FAD, NADPH. Miejsca mirystylacji NOS3 zaznaczono strzałkami.

rolę NO w metabolizmie różnych komórek należałoby oczekiwać, że mutacje genów *Nos* będą wywoływały objawy chorobowe.

Po stronie 5' genu *Nos3* wykryto trzy mutacje: T786C, A922G oraz T1468A. Tylko pierwsza z nich powoduje zmniejszenie aktywności promotora, natomiast druga i trzecia nie wywierają wpływu na ekspresję genu. Przypuszcza się, że nosiciele tranzycji T786C mogą mieć predyspozycję do skurczu naczyń wieńcowych (*coronary spasm*) [100].

Najczęściej opisywaną mutacją genu *Nos3* jest transwersja G894T w eksonie 7. W jej wyniku w cząsteczce białka następuje zamiana glutaminy na asparaginę w pozycji 298 (E298→D) [101-106]. Opinie na temat związku tej mutacji z zawałem mięśnia sercowego oraz chorobą naczyń wieńcowych są rozbieżne. Niektórzy badacze wykluczają istnienie związku występowania tej mutacji z chorobami układu krążenia [101, 102, 104], inni uważają ją za wysoki czynnik ryzyka [106]. Poszukuje się także

Tabela 3.

Wielkości eksonów i intronów genów syntaz tlenku azotu

nos 1				*nos 2*				*nos 3*			
ekson	wielkość (pz)	intron	wielkość (kpz)	ekson	wielkość (pz)	intron	wielkość (kpz)	ekson	wielkość (pz)	intron	wielkość (kpz)
1	266	1	≥ 25	1	191	1	1,5	1	180	1	1,2
2	1145	2	≥ 25	2	183	2	1	2	112	2	1,4
3	127	3	20	3	85	3	0,7	3	149	3	0,2
4	129	4	2	4	124	4	1	4	163	4	1,4
5	146	5	1,8	5	148	5	6	5	92	5	0,09
6	163	6	0,8	6	163	6	0,8	6	142	6	0,3
7	92	7	0,8	7	91	7	0,9	7	140	7	0,1
8	142	8	12	8	143	8	0,1	8	175	8	1,1
9	140	9	2,7	9	140	9	1,7	9	102	9	0,6
10	175	10	4	10	175	10	0,1	10	195	10	0,1
11	102	11	2,3	11	101	11	4	11	74	11	0,2
12	195	12	1,4	12	278	12	0,65	12	145	12	0,2
13	86	13	3,3	13	145	13	1,25	13	105	13	4,1
14	145	14	1,3	14	105	14	1,4	14	68	14	0,4
15	105	15	0,7	15	50	15	0,4	15	117	15	0,07
16	59	16	5	16	175	16	1,2	16	175	16	1,6
17	117	17	6	17	133	17	1,6	17	133	17	0,1
18	175	18	4	18	79	18	0,8	18	79	18	0,1
19	139	19	0,6	19	182	19	1,5	19	188	19	0,5
20	79	20	8	20	164	20	1	20	173	20	0,3
21	194	21	6	21	207	21	1,7	21	211	21	0,09
22	170	22	1,1	22	89	22	0,42	22	88	22	1,4
23	211	23	0,7	23	122	23	0,6	23	122	23	0,76
24	88	24	1,5	24	149	24	1	24	149	24	0,3
25	122	25	2	25	194	25	1,4	25	195	25	0,09
26	149	26	0,3	26	586			26	580		
27	195	27	2								
28	119	28	2,8								
29	2150										

związku transwersji G894T z powikłaniami naczyniowymi występującymi przy cukrzycy typu drugiego [105]. Zauważono też, że homozygoty TT oraz heterozygoty GT wykazują o wiele silniejszą odpowiedź na stymulację α-adrenergiczną (fenylefryną) niż homozygoty GG [103]. W genie *Nos3* opisano także transwersję G1917T, która jednak nie pozostaje w bezpośrednim związku z schorzeniami układu krążenia [98].

Artykuł otrzymano 15 kwietnia 1999 r.
Zaakceptowano do druku 6 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Wójcik C, Gołąb J (1999) *Post Biol Kom* **26**: 219-229
2. Fukuto JM (1995) *Adv Pharmacol* **34**: 1-15
3. Gryglewski RJ, Rytlewski K, Zdebski Z, Kostka-Trąbka E (1998) *II Kongres Polskiego Towarzystwa Medycyny Perinatalnej Katowice 10-12.IX.1998, Tlenek azotu w położnictwie:* 143-152

4. Ignarro LJ (1996) *Kidney Int Suppl* **55**: 2-5
5. Dembińska-Kieć A (1995) w: Konarska L (red) *Molekularne sygnały przekazywania sygnałów w komórce*, str. 177-189
6. Wang Y, Marsden PA (1995) *Adv Pharmacol* **34**: 71-90
7. Forstermann U, Kleinert H (1995) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**: 351-364
8. Hattori R, Sase K, Eizawa H, Kosuga K, Aoyama T, Inoue R, Sasayama S, Kawai C, Yui Y, Miyahara K (1994) *Int J Cardiol* **47**: 71-75
9. Gryglewski RJ (1989) *J Cardiovasc Pharmacol* **14**: 124-128
10. Stryer L (1997) *Biochemia*, PWN Warszawa str. 781, 910
11. Masters BS, McMillan K, Sheta EA, Nishimura JS, Roman LJ, Martasek P (1996) *FASEB J* **10**: 552-558
12. Schmidt HHHW, Nau H, Wittfoht W (1988) *Eur J Pharmacol* **154**: 213-216
13. Palmer RM, Asthon DS, Moncada S (1988) *Nature Lond* **333**: 664-666
14. Moncada S, Knowles RG (1994) *Biochem J* **298**: 249-
15. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z (1987) *Science* **235**: 473-476
16. Mayer B, Hemmens B (1997) *T Biochem Sci* **22**: 477-481
17. Wu G, Morris SM (1998) *Biochem J* **336**: 1-17
18. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 802-807
19. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993) *J Biol Chem* **268**: 17478-17488
20. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1991) *J Biol Chem* **267**: 10976-10981
21. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) *Nature Lond* **288**: 373-376
22. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) *Circul Res* **61**:866-879
23. Ignarro LJ i wsp. (1987) *Proc Natl Acad Sci* **84**: 9265-9269
24. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) *Nature Lond* **327**: 524-526
25. Murad F, Arnold W, Mittal CK, Katsuki S (1977) *Proc Natl Acad Sci* **74**: 3203-3207
26. Murad F, Arnold W, Katsuki S (1977) *J Cyc Nucl Res* **3**: 239-247
27. Murad F, Arnold W, Mittal CK,Ichihara K, Braughler M, El-Zayat M (1978) *Molecular biology and pharmacology of cyclic nucleotides*: 33-42
28. Gibbs WW, Nemeck S, Stix G (1999) *Świat Nauki* **90**: 8-11
29. Gryglewski RJ, Kostka-Trąbka E, Zdebski Z (1998) *Tlenek azotu w medycynie. Problemy Perinatologii Klinicznej* cz. II., str. 48-58
30. Davson VL, Davson TM (1996) *Neurochem Int* **29**: 97-110
31. Noll G, Tschudi M, Nava E, Luscher TF (1997) *Int J Microcirc Clin Exp* **17**: 273-279
32. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerm RM, Harrison DG (1995) *Am J Physiol* **269**: 1371-1378
33. Busse R, Fleming I (1998) *J Vasc Res* **35**: 73-84
34. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1987) Brit J Pharmacol **92**: 639-646
35. Gryglewski RJ (1993) *Semin Thromb Hemostas* **19**: 158-166
36. Gryglewski RJ i wsp. (1993) *J Physiol Pharmacol* **44**: 313-318
37. Balligand JL, Cannon PJ (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 1846-1858
38. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA (1994) *J Biol Chem* **269**: 33082-33090
39. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS (1994) *J Biol Chem* **269**: 6765-6772
40. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 1027-1033
41. Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L, Emson P (1994) *Genomics* **21**: 419-422
42. Nunokawa Y, Oikawa S, Tanaka S (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 347-352
43. Chu SC, Wu HP, Banks TC, Eissa NT, Moss J (1995) *J Biol Chem* **270**: 10625-10630
44. Reiling N, Ulmer AJ, Duchrow M, Ernst M, Flad HD, Hautschildt S (1994) *Eur J Immunol* **24**: 1941-1944
45. Zhang X, Laubach VE, Alley EW, Edwards KA, Sherman PA, Russell SW, Murphy WJ (1996) *J Leukoc Biol* **59**: 575-585
46. Spitsin SV, Koprowski H, Michaels FH (1996) *Mol Med* **2**: 226-235
47. Nadaud S, Soubrier F (1995) *C R Seances Soc Biol Fil* **189**: 1025-1038
48. Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S (1994) *Genomics* **19**: 350-357
49. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Billar TR, Geller DA (1998) *J Biol Chem* **273**: 15148-15156
50. Sakitani K, Nishizawa M, Inoue K, Masu Y, Okumura T, Ito S (1998) *Genes Cells* **3**: 321-330
51. Chang CC, McCormick CC, Lin AW, Dieter RR, Sung YJ (1996) *Am J Physiol* **271**: 539-548
52. Nathan C, Xie QW (1994) *J Biol Chem* **269**: 13725-13728
53. Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SLM, Kulkarni G, D'Abreo C,Wong GKT, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA (1999) *J Biol Chem* **274**: 3076-3093
54. Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y (1994) *Eur J Biochem* **223**: 719-726
55. Harrison DG, Venema RC, Arnal JF, Inoue N, Ohara Y, Sayegh H, Murphy TJ (1995) *Agents Actions Suppl* **45**: 107-117
56. Sharp PA (1992) *Cell* **68**: 819-821
57. Zhang R, Min W, Sessa WC (1995) *J Biol Chem* **270**: 15320-15326
58. Orkin SH (1990) *Cell* **63**: 665-672
59. Yamamoto M, Ho LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD (1990) *Genes Dev* **4**: 1650-1662
60. Rosenfeld PJ, Kelly TJ (1986) *J Biol Chem* **261**: 1398-1408
61. Rossi P, Karsenty G, Roberts AB, Roche NS, Sporn MB, deCrombrugghe B (1988) *Cell* **52**: 405-414
62. Comb M, Mermod N, Hyman SE, Pearlberg J, Ross ME Goodman HM (1988) *EMBO J* **7**: 3793-3805
63. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M (1987) *Cell* **49**: 729-739
64. Imagawa M, Chiu R, Karin M (1987) Cell **51**: 251-260
65. Hyman SE, Comb M, Pearlberg J, Goodman HM (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 321-324
66. Luscher TF, Barton M, Wight E, Espinosa E, Yang Z (1996) *Schweiz Med Wochenschr* **126**: 1748-1755
67. Osborne TF, Gil G, Goldstein JL, Brown MS (1988) *J Biol Chem* **263**: 3380-3387
68. Stuart GW, Searle PF, Palmiter RD (1985) *Nature Lond* **317**: 828-831
69. Phelan MW, Faller DV (1996) *Cell Physiol* **167**: 469-476
70. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B (1992) *Science* **256**: 827-830
71. Santhanam U, Ray A, Sehgal PB (1991) *Proc Natl Acad Sci* **88**: 7605-7609
72. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) *Cell* **70**: 523-526
73. Brenman JE, Xia H, Chao DS , Black SM, Bredt DS (1997) *Dev Neurosci* **19**: 224-231
74. Geller DA, Billar TR (1998) *Cancer Metastasis Rev* **17**: 7-23
75. McMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) *Annu Rev Immunol* **15**: 323-350
76. Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J (1996) *J Biol Chem* **271**: 27184-27187

77. Wang Y, Marsden PA (1995) *Curr Opin Nephrol Hypertens* **4**: 12-22
78. Park CS, Park R, Krishna G (1996) *Life Sci* **59**: 219-225
79. O'Donell TJ, Huang PL, Dawson TD, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) *Science* **265**: 542-546
80. Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M, Forstermann U (1994) *Am J Physiol* **266**: 22-28
81. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA (1994) *J Clin Invest* **94**: 2231-2236
82. Reiling N, Ulmer AJ, Duchrow M, Ernst M, Flad H, Hauschildt S (1994) *Eur J Immunol* **24**: 1941-1944
83. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) *FASEB* **12**: 773-90
84. Weiner CP i wsp. (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**: 5212-5216
85. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992) *Proc Natl Acad Sci* **89**: 6348-6352
86. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992) *J Clin Invest* **90**: 2092-2096
87. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T (1992) *FEBS* **307**: 287-293
88. Shaw G, Kamen R (1986) Cell **46**: 659-667
89. Searles CD, Miwa Y, Harrison DG, Ramasamy S (1999) *Circ Res* **85**: 588-95
90 Chen PF, Tsai AL , Berka V, Wu KK (1996) *J Biol Chem* **271**: 14631-14635
91. Bredt DS, Snyder SH (1990) *Proc Natl Acad Sci* **87**: 682-685
92. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Harald HH, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F (1991) *Proc Natl Acad Sci* **88**: 10480-10484
93. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J (1991) *J Biol Chem* **266**: 6259-6263
94. Chen PF, Tsai AL , Berka V, Wu KK (1998) *J Biol Chem* **273**: 34164-34170
95. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) *Nature Lond* **351**: 714-718
96. Xie Q, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan CF (1992) *Science* **256**: 225-228
97. Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**: 10769-10772
98. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S (1998) *Hypertension* **32**: 521-526
99. Nakagami H, Ikeda U, Maeda Y, Yamamoto K, Hojo Y, Kario K, Kuroki S, Shimada K (1999) *J Thromb Thrombolysis* **8**:191-195
100. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamota Y, Nakao K (1999) *Circulation* **99**: 2864-70
101. Cai H, Wilcken DE, Wang XL (1999) J Mol Med **77**: 511-4
102. Liao YL, Saku K, Ou J, Jimi S, Zhang B, Shirai K, Arakawa K (1999) *Angiology* **50**: 671-6
103. Philip I, Plantefeve G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmonts JM, Durand G, Benessiano J (1999) *Circulation* **99**: 3096-8
104. Liyou N, Simons L, Friedlander Y, Simons J, McCallum J, O'Shaughnessy K, Davis D, Johnson A (1998) *Clin Genet* **54**: 528-529
105. Cai H, Wang X, Colagiuri S, Wilcken DE (1998) *Diabetes Care* **21**: 2195-2196
106. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Broen MJ (1999) *Circulation* **100**: 1515-1520

Grupa kinaz białkowych CKI

The group of protein kinases CKI

IWONA WOJDA*

Spis treści:

Contens:

Wykaz stosowanych skrótów: CKI — kinaza białkowa CKI (CK — skrót od nazwy zwyczajowej — ang. *casein kinase*); cAMP — cykliczny adenozyno-3'5'-monofosforan, CREM — czynnik transkrypcyjny (ang. cAMP *responsive element modulator*); ATP — adenozyno-5'-trifosforan, mRNA — informacyjny RNA; BSA — albumina surowicy wołu; eIF — eukariotyczny czynnik inicjacyjny translacji; A(Ala) — alanina; D(Asp) — kwas asparaginowy; E(Glu) — kwas glutaminowy; G(Gly) — glicyna; L(Leu) — leucyna; R(Arg) — arginina; N(Asn) — asparagina; p — reszta kwasu fosforowego; S(Ser) — seryna, T(Tre) — treoniona; V (Val) — walina; X — dowolny aminokwas; Y(Tyr) — tyrozyna. Oznaczenia poszczególnych form CKI są zawarte w Tabelach: 1 i 2.

I. Wstęp

Odwracalna fosforylacja jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych rodzajów modyfikacji białek w przyrodzie. W komórkach eukariotycznych około 30% białek to substraty dla kinaz białkowych. Przyłączanie i odłączanie reszty fosforanowej reguluje aktywność enzymatyczną wielu białek, ich lokalizację subkomórkową czy też zdolność do tworzenia większych kompleksów. U Eukaryota najbardziej istotne znaczenie regulacyjne ma fosforylacja białek w resztach serynowych, treoninowych oraz tyrozynowych, katalizowana przez kinazy białkowe serynowo/ treoninowe oraz tyrozynowe.

Pierwszy dowód na istnienie fosfobiałek pochodzi już z roku 1883, kiedy to Hammarsten wykazał, że białkowy składnik mleka — kazeina zawiera znaczne ilości fosforanu [1]. Prawie wiek poźniej kazeina zaczęła być stosowana jako substrat do badania aktywności kinaz białkowych *in vitro*. Doprowadziło to do wykrycia dwóch klas fosfotransferaz, nazwanych następnie: kinaza kazeinowa 1 (CKI) oraz kinaza kazeinowa 2 (CKII), według kolejności ich elucji z DEAE celulozy [2, 3 , 4 — praca przeglądowa]. Nazwa „kinazy kazeinowe" stosowana była w literaturze przez długie lata. Była to nazwa przyjęta zwyczajowo, jednak nie w pełni uzasadniona i przez to myląca, bowiem nie należy kojarzyć CKI i CKII z enzymami modyfikującymi kazeinę *in vivo* w gruczołach mlecznych ssaków. Kazeina była i jest jedynie białkiem rutynowo stosowanym jako egzogenny substrat przy oznaczaniu aktywności enzymatycznych kinaz *in vitro*. Obecnie, nie stosuje się już nazwy „kinazy kazeinowe", a CKI i CKII, nazywa się odpowiednio „kinaza białkowa CKI" oraz „kinaza białkowa CKII". Należy tu podkreślić, że pomimo, iż enzymy te mają podobną nazwę, są one strukturalnie i funkcjonalnie odmiennymi fosfotransferazami.

Przedstawione poniżej dwie prace przeglądowe pt: „Grupa kinaz białkowych CKI" oraz „Kinaza białkowa CKII" są próbą podsumowania obecnego stanu wiedzy o pierwszych, odkrytych prawie pięćdziesiąt lat temu, kinazach białkowych, z uwzględnieniem olbrzymiego postępu w badaniach, jaki dokonał się w ciągu ostatnich dziesięciu lat.

*Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

II. Ogólna charakterystyka kinazy białkowej CKI

Kinaza białkowa CKI należy do kinaz seryno-wo/treoninowych, niezależnych od cyklicznych nukleotydów. Obecność CKI wykazano we wszystkich zbadanych do tej pory organizmach eukariotycznych. Enzym ten występuje w komórce w formie wolnej w cytoplazmie, w formie związanej z błonami, a także w jądrze i mitochondriach [5, 6]. Kinaza białkowa CKI izolowana jest zawsze w formie aktywnego monomeru o masie cząsteczkowej w granicach 25kDa–65kDa. CKI fosforyluje *in vitro* białka cytoszkieletu takie jak miozyna, ankyrina, troponina, spektryna; polimerazy RNA I i II; czynniki inicjacyjne translacji: eIF4B, eIF4E, eIF5; syntetazy aminoacylo-tRNA; duży antygen T wirusa SV40; receptor insuliny; podjednostkę regulatorową fosfatazy 1 (inhibitor 2); syntazę glikogenu, białko p53, białka rybosomowe i inne [6-9]. Tylko w nielicznych przypadkach fosforylacja danego białka została potwierdzona *in vivo* i wydaje się być skorelowana z jego funkcją. Wykazano na przykład, że fosforylacja fosfatazy I powoduje hamowanie aktywności enzymu [10]. Zdolność białka CREM do wiązania się z DNA jest znacznie większa po fosforylacyjnej modyfikacji przez CKI. Aktywność syntazy glikogenu jest silnie hamowana po fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP, a następnie przez CKI [11]. Natomiast białko p53 po fosforylacyjnej modyfikacji przez CKI jest aktywowane. Zależność pomiędzy fosforylacją białka przez CKI a jego funkcją wykazano również w przypadku dużego antygenu T wirusa SV40. Fosforylacja tego białka powoduje zahamowanie inicjacji replikacji wirusowego DNA [12, 13].

III. Kinaza białkowa CKI — „gracz zespołowy"

Badania biochemiczne nad kinazą CKI, jak wcześniej wspomniano, trwają już od kilkudziesięciu lat. Niejednokrotnie doniesienia z poszczególnych laboratoriów odnośnie właściwości tego enzymu bywały różne. Dotyczyło to między innymi masy cząsteczkowej CKI, lokalizacji subkomórkowej czy też niektórych właściwości biochemicznych enzymu. Dopiero na początku lat dziewięćdziesiątych w literaturze zaczęły pojawiać się wyniki badań genetycznych, wskazujące na obecność wielu form CKI kodowanych przez niezależne geny.

U ssaków wykazano obecność 7 genów kodujących różne formy CKI. W drożdżach pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* istnieją 4 geny, natomiast u drożdży rozszczepkowych *Schizosaccharomyces pombe* wykazano obecność 5 genów kodujących różne formy tego enzymu. Poszczególne formy CKI, zarówno u ssaków jak i u drożdży mają różną wielkość, różną lokalizację subkomórkową oraz pełnią różne funkcje w komórce. Przedstawione poniżej tabele są próbą uporządkowania obecnego stanu wiedzy odnośnie występowania kinazy białkowej CKI u ssaków (Tabela 1) oraz drożdży (Tabela 2). Można przypuszczać, że badania najbliższych lat przyniosą odpowiedzi na wiele pytań odnośnie występowania i funkcji CKI w komórkach eukariotycznych.

Mnogość form kinazy białkowej CKI potęguje fakt, że w wyniku alternatywnego składania genów mogą powstawać dodatkowe warianty CKI. Tak jest w przypadku CKIα, której liczba wariantów sięga ośmiu i CKIγ_3, występującej w dwóch alternatywnych formach [8]. Zwiększa to do 16 ilość form kinazy białkowej CKI u ssaków.

Wszystkie poznane formy kinazy CKI posiadają koniec aminowy składający się z 9-76 aminokwasów, ściśle zachowany obszar katalityczny zawierający około 300 aminokwasów oraz koniec karboksylowy, którego długość jest różna w poszczególnych enzymach i waha się w granicach od 24 do 200 aminokwasów. Niektóre formy CKI u drożdży (Yck1p, Yck2p, Yck3p, Cki1, Cki2) w końcu karboksylowym posiadają miejsce ulegające prenylacji. Modyfikacja ta umożliwia przyłączenie tych enzymów do błony komórkowej. W przeciwieństwie do drożdży, żadna z CKI znaleziona u ssaków nie ulega prenylacji [8, 32].

Wszystkie formy kinazy białkowej CKI w swoich domenach katalitycznych wykazują bardzo wysoki stopień identyczności. Zawsze wynosi on powyżej 50% podczas gdy w stosunku do innych kinaz nie przekracza 20%. Rycina 1 przedstawia filogenetyczne pokrewieństwo poszczególnych form kinazy białkowej CKI.

Kinaza białkowa CKI z powodu występowania w wielu formach określana jest w literaturze jako „gracz zespołowy". Spotyka się również stwierdzenie, że komórki eukariotyczne posiadają nadmiar genów kodujących CKI. Istotnie, spośród mnogości form CKI można wyróżnić enzymy mające tę samą lokalizację subkomórkową oraz pełniące podobne funkcje w komórce. Wykazano, że u *S. cerevisiae* *HRR25* i *YCK3* tworzą niezbędną dla przeżywalności komórki parę genów, których produkty białkowe zlokalizowane są w jądrze komórkowym i biorą udział w procesach naprawy DNA. Delecja każdego z tych genów powoduje jedynie zmiany fenotypowe, pod-

czas gdy delecja obydwu jest letalna [23, 27]. U *Schizosaccharomyces pombe* parę enzymów o podobnej funkcji stanowią Hhp1 i Hhp2. U ssaków natomiast udział w naprawie DNA biorą: CKIδ, CKIε oraz CKIα. Wykazano, że ekspresja ssaczych form CKI, odpowiedzialnych za procesy naprawy DNA w komórkach *S. cerevisiae* defektywych w genie *HRR25*, umożliwia komórkom drożdży odzyskanie prawidłowego fenotypu.

IV. Udział kinazy białkowej CKI w procesach naprawy DNA

W cyklu komórkowym organizmów eukariotycznych wyróżnić można 3 punkty kontrolne, które w przypadku uszkodzenia DNA opóźniają podział komórki. Punkty te znajdują się w fazie G_1, S oraz na granicy faz G_2/M. W tym czasie uruchamiane zostają mechanizmy umożliwiające naprawę DNA. Indukowana jest wówczas ekspresja genów zaangażowanych w ten proces. Są to między innymi: geny kodujące dużą (*RNR2*) oraz małe (*RNR1* i *RNR3*) podjednostki reduktazy rybonukleotydowej, gen kodujący białko odpowiedzialne za naprawę rekombinacyjną DNA (*RAD54*), polimerazę 1 DNA *(POL1)*, ligazę DNA (*CDC9*) [23].

Tabela 1.

Formy CKI zidentyfikowane u ssaków.

Forma CKI	**Masa cząsteczkowa białka**	**Lokalizacja w komórce**	**Proces komórkowy w którym dany enzym uczestniczy/ funkcja**	**Literatura**
CKIα	35 kDa (z grasicy wołu)	Lokalizacja zależna od fazy cyklu komórkowego: w interfazie — struktury pęcherzykowe; w czasie mitozy — włókna wrzeciona podziałowego; jądro	Segregacja chromosomów w czasie podziału; kontrola cyklu komórkowego; dojrzewanie mRNA	[14, 15, 16, 17, 18]
CKIβ	39 kDa (z mózgu wołu)	?	?	[8, 17]
CKIγ_1	43 kDa (z jąder szczura)	?	Funkcja nie poznana. Wiadomo, że ekspresja CKIγ_1 i CKIγ_3 u *S. cerevisiae* powoduje częściową supresję mutacji Δ*YCK*. Sugeruje się, że CKIγ_2 może brać udział w przekazywaniu sygnałów zewnątrzkomórkowych.	[8, 17, 19]
CKIγ_2	45 kDa (z jąder szczura)	?		
CKIγ_3	50 kDa (z jąder szczura)	?		
CKIδ	49 kDa (z jąder szczura)	Jądro komórkowe	Metabolizm DNA, głównie naprawa DNA	[20, 21]
CKIε	47 kDa (z łożyska ludzkiego)	Jądro komórkowe	Metabolizm DNA	[22]

Kolejną parę genów kodujących kinazy CKI o podobnej funkcji stanowią: *YCK1* i *YCK2* u *S. cerevisiae* [25]. Inną sytuację obserwuje się u drożdży *S. pombe*, u których *cki1* i *cki2* nie stanowią pary genów, a ich produkty białkowe wydają się spełniać różne funkcje w komórce [30]. U drożdży nie znaleziono form CKI odpowiadających ssaczym formom CKIα i CKIβ. Prawdopodobnie enzymy te biorą udział w procesach charakterystycznych dla bardziej złożonych organizmów eukariotycznych. Dotychczas, dwie spośród form kinazy białkowej CKI tj. Cki1 i CKIδ zostały otrzymane w formie krystalicznej [33, 34]. Strukturę domeny katalitycznej Cki1 z *S. pombe* przedstawia rycina 2.

Zauważono, że drożdże *S. cerevisiae* z dysrupcją genu *HRR25* są nadwrażliwe na działanie niektórych czynników powodujących uszkodzenie DNA takich jak: promieniowanie X, działanie endonukleazy czy działanie MMS (ang. *methyl methanesulfonate*) oraz promieniowanie γ. Mutanty te są niezdolne do induk-

cji transkrypcji genów *RNR2* i *RNR3* po zadziałaniu HU (hydroksyuracyl) na komórki drożdżowe [35].

Okazało się, że kinaza Hrr25p fosforyluje *in vitro* białko Swi6. Białko to w połączeniu z białkiem Swi4 tworzy czynnik transkrypcyjny SBF. H o i współpracownicy sugerują [23], że fosforylacja białka Swi6 przez kinazę Hrr25p umożliwia indukcję genów zależnych od czynnika SBF odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA spowodowanych działaniem HU. Być może fosforylacja białka Swi6 umożliwia przedostanie się jego do jądra w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Wykazano również, że nadekspresja białka Swi4 powoduje odzyskanie prawidłowego fenotypu drożdży *S. cerevisiae* z dysrupcją genu *HRR25*, co sugeruje istnienie równoległego, niezależnego od kinazy Hrr25p mechanizmu regulacji aktywności czynnika SBF [23].

Tabela 2.

Formy CKI zidentyfikowane u drożdży.

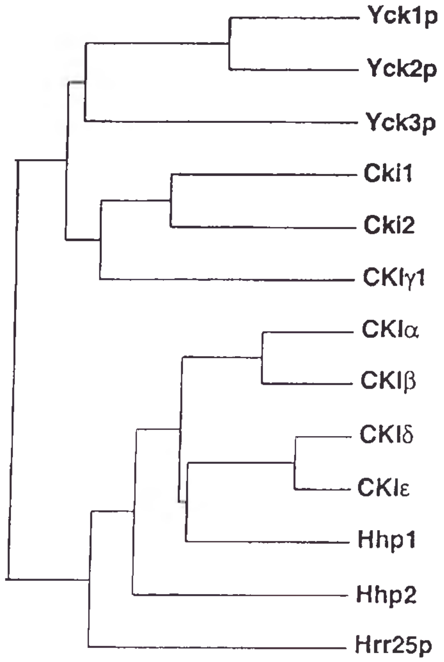
Gen	Białko	Masa cząsteczkowa białka	Lokalizacja w komórce	Proces komórkowy w którym dany enzym uczestniczy/ funkcja	Literatura
			Saccharomyces cerevisiae		
YCK1	Yck1p	62 kDa	Błona komórkowa; cytosol	Morfologia pączków; cytokineza; transport pęcherzykowy; halotolerancja; metabolizm heksoz.	[23-26]
YCK2	Yck2p	62 kDa	Błona komórkowa; cytosol		
HRR25	Hrr25p	58 kDa	Jądro komórkowe	Prawidłowy wzrost drożdży, podziały komórek, naprawa DNA, sporulacja	[27]
YCK3	Yck3p	60 kDa	Jądro komórkowe; błona komórkowa	Metabolizm DNA.	[28]
			Schizosaccharomyces pombe		
hhp1	Hhp1	Około 42kDa-46kDa	Jądro komórkowe	Naprawa DNA	[29]
hhp2	Hhp2				
cki1	Cki1	55 kDa	Cytosol; błona komórkowa	?	[30]
cki2	Cki2	55 kDa	Cytosol	Morfologia komórki	[30]
cki3	Cki3	?	Prawdopodobnie cytosol	Prawdopodobny udział w adaptacji drożdży do warunków głodowych	[31]

V. Specyficzność substratowa CKI

Struktura pierwszorzędowa kinazy białkowej CKI pozwoliła sklasyfikować ten enzym w grupie kinaz serynowo/treoninowych. CKI należy również do nie- wielkiej grupy kinaz "kwasotroficznych" tj. rozpoznających akceptorowy aminokwas w otoczeniu aminokwasów o charakterze kwaśnym. Za klasyczną sekwencję rozpoznawaną przez CKI jako miejsce fosforylacji uważa się motyw E-X-X-**S/T** lub Sp/Tp/Yp-X-X- **S/T** [8, 36]. Okazało się jednak, że obecność fosfoseryny czy fosfotreoniny, a nawet fosfotyrozyny w pozycji –3 w stosunku do miejsca przyjmującego resztę fosforanową jest korzystniejsza niż obecność kwasu asparaginowego czy glutaminowego w tej samej pozycji. Wynika z tego, że wiele białek może stać się substratem dla kinazy białkowej CKI dopiero po uprzednim ufosforylowaniu przez inny enzym. Istotnie, wykazano, że fosforylacja syntazy glikogenu z mięśni królika przez kinazę zależną od cAMP powoduje, że białko to jest wówczas intensywniej fosforylowane przez CKI. Syntaza glikogenu posiada 3 charakterystyczne dla kinazy A miejsca fosforylacji. Są to: Ser^{7}, Ser^{697} oraz Ser^{710} [11]. Fosforylacja przez kinazę zależną od cAMP seryny w pozycji 7 sprawia, że Ser^{10} może być fosforylowana przez kinazę CKI. Ponadto wykazano, że defosforylacja kazeiny powoduje, że białko to

staje się znacznie słabszym substratem dla CKI [37, 38].

Obecność ufosforylowanej seryny czy treoniny w pozycji –3 nie jest jednak niezbędna, jeśli w pobliżu znajdują się aminokwasy o charakterze kwaśnym. Tak jest w przypadku α kazeiny, gdzie kinaza CKI fosforyluje Ser^{135} w sekwencji: Sp-E-E-N-**S**. Ufosforylowana uprzednio seryna znajduje się tu w pozycji –4, natomiast obecność dwóch reszt kwasu glutaminowego w pozycjach –2 i –3 prawdopodobnie powoduje nagromadzenie ujemnie naładowanych reszt co jest wystarczające dla rozpoznania Ser^{135} jako akceptora reszty fosforanowej. Podobną sytuację obserwuje się w przypadku fosforylacji inhibitora 2 (fosfatazy1), u którego po stronie aminowej od miejsca fosforylacji brak jest w ogóle fosfoseryny, a Ser^{86} jest fosforylowana w sekwencji D-D-D-D-A-Y-**S**. Tak więc w tym przypadku obecność czterech reszt kwasu asparaginowego umożliwia rozpoznanie Ser^{86} jako akceptora reszty fosforanowej [15].



Ryc. 1. Filogenetyczne pokrewieństwo wśród kinaz CKI [8]. Na uwagę zasługuje fakt, że ssacze formy CKIγ są najbardziej spokrewnione z drożdżowymi YCK i Cki. Z kolei CKIδ i CKIε wykazują największą homologię z Hhp1, Hhp2 oraz Hrr25p. Jak wspomniano w tekście CKIα i CKIβ nie mają swoich odpowiedników wśród drożdżowych form CKI.

W ostatnim czasie w literaturze naukowej pojawiło się kilka prac wskazujących, że niektóre formy CKI mają zdolność do przyłączania reszt fosforanowych również do tyrozyny. Wykazano, że kinaza Hrr25p z drożdży *S. cerevisiae* oraz Hhp1, Hhp2 i Cki1 z drożdży *S. pombe* są enzymami o tzw. podwójnej specyficzności. Każdą z tych kinaz poddano ekspresji w komórkach *E. coli* i wykazano, że są one rozpoznawane przez przeciwciała skierowane przeciw fosfotyrozynie. Wykazano także, że formy CKI z drożdży *S. pombe* ulegają autofosforylacji *in vitro* w resztach tyrozynowych, a co więcej, kinazy Hhp1 oraz Hhp2 fosforylują tyrozynę w peptydzie poli E_4Y_1. Zaobserwowano także, że defosforylacja Hhp1 i Hhp2 przez fosfatazę serynowo/treoninową nie ma większego wpływu na aktywność tych enzymów, podczas gdy defosforylacja tyrozyny pociąga za sobą 2-3 krotny spadek ich aktywności w stosunku do substratów takich jak kazeina czy peptyd E_4Y_1. Sugeruje to, że obecność fosfotyrozyny może pozytywnie regulować aktywność wyżej wymienionych form CKI [35].

Wyniki powyższych badań są zgodne z wcześniejszą obserwacją, że kinaza CKI z ludzkich erytrocytów może również fosforylować reszty tyrozynowe. Oczyszczona CKI z cytoplazmy ludzkich erytrocytów fosforyluje peptyd poli E_2Y_1, a ponadto angiotensynę II, alkilowaną BSA oraz ankyrinę w resztach tyrozynowych [39].

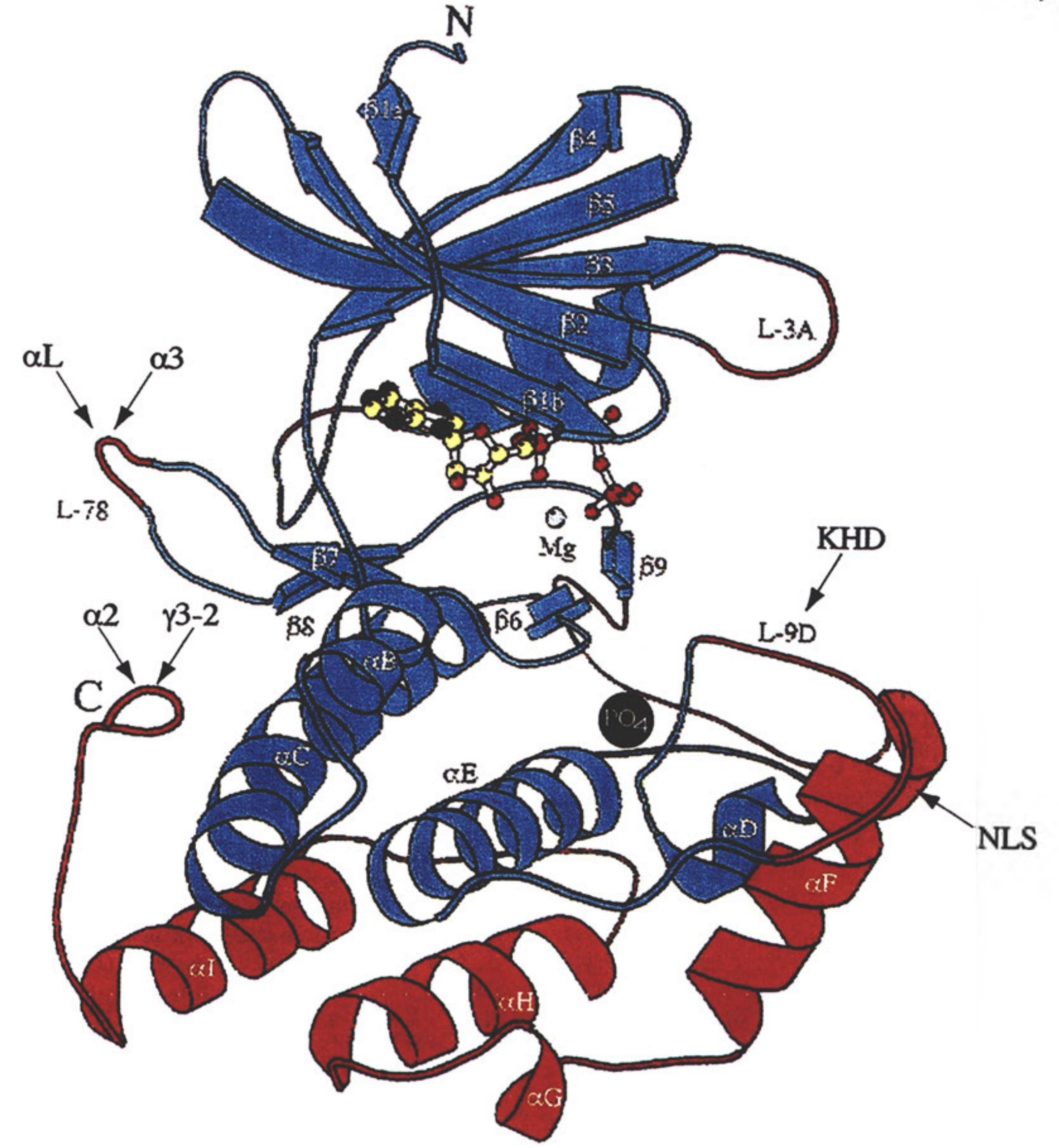
Tak więc niektóre formy kinazy CKI powiększają listę kinaz o podwójnej specyficzności.

Wśród drożdżowych kinaz o podwójnej specyficzności znajdują się między innymi: kinazy Mck1, Spk1, Fus3, Kss1, Ste7 drożdży *S. cerevisiae* oraz kinazy Byr1, Byr2 drożdży *S. pombe* [40, 41].

VI. Regulacja aktywności kinazy białkowej CKI

Jednym z testów sprawdzających właściwości biochemiczne kinaz jest badanie wrażliwości tych enzymów na działanie heparyny. Polisacharyd ten jest silnym inhibitorem kinazy białkowej CKII [6] i w niektórych przypadkach aktywatorem podjednostki katalitycznej kinazy zależnej od cAMP [42, 43]. Ponadto heparyna aktywuje kinazę zależną od dwuniciowego RNA (PKR) [44, 45], wpływa również na aktywność niektórych kinaz tyrozynowych [46, 47]. Okazuje się, że wpływ heparyny na aktywność CKI jest zróżnicowany i zależy zarówno od formy enzymu, jak również od rodzaju substratu [48, 49].

Okazało się, że heparyna stymuluje fosforylację syntetycznego, specyficznego dla CKI peptydu D4 (DDDDVASLPGLRRR) przez rekombinacyjną CKIδ. Stymulację obserwuje się również po defosforylacji CKIδ przez podjednostkę katalityczną fosfatazy pierwszej (CS1). Jeśli natywną formę CKIδ pozbawi się końcowych 110 aminokwasów, enzym staje się wówczas niewrażliwy na działanie heparyny. Ciekawym wydaje się również fakt, że forma CKIα



Ryc. 2. Struktura III-rzędowa domeny katalitycznej Cki1 z *Sch. pombe* w kompleksie z MgATP [34]. Domena katalityczna składa się z dwóch płatów: N-koniec cząsteczki tworzy mniejszy płat, w którym dominuje struktura β. Obszar ten jest miejscem wiązania trifosfonukleotydu. Większy płat o strukturze α-helisy zawiera sekwencje uczestniczące w przenoszeniu reszty fosforanowej. Szczelina, znajdująca się między obydwoma płatami wchodzi w interakcje z białkowym substratem. Obydwa płaty połączone są tzw. regionem zawiasu (pętla L-78), który decyduje o konformacji szczeliny. NLS — sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*); KHD — ang. *kinesin homology domain* (pętla L-9D); L — pętla (ang. *loop*). α2, αL, α3, γ3-2 — tzw. wstawki, domeny występujące w niektórych wariantach CKI. PO_4 – oznacza miejsce rozpoznające i wiążące resztę fosforanową w białku substratowym

mająca bardzo krótki C-koniec nie jest aktywowana przez heparynę, a nawet jest w niewielkim stopniu hamowana [20].

Badania prowadzone przez grupę kierowaną przez Roach wykazały, że koniec karboksylowy CKI odgrywa istotną rolę w regulacji aktywności tego enzymu [19]. Istnieją dowody, że fosforylacja aminokwasów w C-końcu jest przyczyną autoinhibicji enzymu. Heparyna oddziałuje z C-końcem CKIδ, co powoduje zmiany konformacji kinazy naśladujące defosforylację [7]. Nie wiadomo jednak czy *in vivo* fosforylacja enzymu w C- końcu jest wynikiem autofosforylacji czy też efektem działania innej kinazy białkowej.

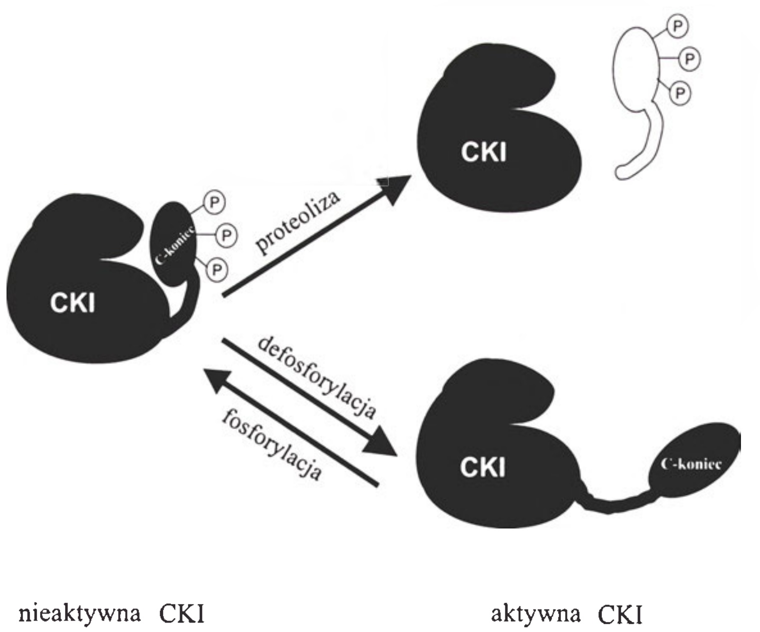
Podobne wyniki zostały uzyskane przez Cegielską i wsp. [50]. Okazało się, że CKIε zawierająca C-koniec o długości 123 aminokwasów z wieloma miejscami fosforylacji jest również aktywowana przez działanie fosfatazy oraz przez ograniczoną proteolizę.

Powyższe obserwacje dowodzą, że ufosforylowany koniec C kinazy białkowej CKI pełni funkcję inhibitora aktywności CKI. Pełna aktywacja enzymu możliwa jest przez:

— proteolityczne usunięcie C-końca
— defosforylację enzymu
— związanie heparyny (i przypuszczalnie innych polianionów)

Przedstawiony poniżej schemat (Ryc. 3) wyjaśnia rolę C-końca w regulacji aktywności kinazy CKI.

Wykazano, że koniec karboksylowy kinazy białkowej CKI bierze również udział w rozpoznawaniu substratu oraz jest odpowiedzialny za lokalizację subkomórkową enzymu. Kinazy Yck1p, Yck2p, Yck3p i Cki1 są prenylowane właśnie w C-końcu, co



Ryc. 3. Regulacja aktywności kinazy CKI przez koniec karboksylowy enzymu. Ufosforylowany C-koniec blokuje dostęp białek do miejsca wiązania substratu. Pełna aktywacja CKI odbywa się przez proteolityczne odcięcie C-końcowego fragmentu cząsteczki lub przez jego defosforylację [50] — zmodyfikowane.

umożliwia „zakotwiczenie" enzymu w błonie komórkowej.

Prawdopodobnie istnieją jeszcze inne mechanizmy regulujące aktywność poszczególnych form CKI. Wykazano, że aktywność CKIα jest hamowana przez fosfoinozytolodifosforan (PIP_2) [51]. Ponadto, lokalizacja subkomórkowa poszczególnych form CKI jest czynnikiem ograniczającym dostępność niektórych substratów do enzymu.

VII. Uwagi końcowe

Wyniki badań prowadzonych od wielu lat wykazują, że kinaza białkowa CKI jest enzymem wielofunkcyjnym, zaangażowanym w wiele procesów komórkowych. Lata dziewięćdziesiąte są wyjątkowo obfite w doniesienia, dotyczące odkrycia kolejnych genów kodujących poszczególne formy CKI, zarówno u drożdży, jak i wyższych organizmów eukariotycznych. Biorąc pod uwagę olbrzymie tempo badań dotyczących funkcji tego enzymu w komórce, określenie specyficznego udziału poszczególnych form kinazy CKI w tak istotnych procesach jak naprawa DNA, czy podziały komórkowe wydaje się już być jedynie kwestią czasu.

Podziękowanie

Bardzo dziękuję Pani Profesor Teresie Jakubowicz za cenne uwagi i sugestie w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 4 listopada 1999 r.
Zaakceptowano do druku 2 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Hammarsten O (1883) *Z Physiol Chem* **7**: 227-273
2. Burnett G, Kennedy EP (1954) *J Biol Chem* **211**: 969-972
3. Hathaway GM, Traugh JA (1979) *J Biol Chem* **254**: 762-768
4. Dobrowolska G (1989) *Postępy Biochemii* **35**: 231-244
5. Grankowski N, Issinger OG (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 471-476
6. Tuazon PT, Traugh JA (1991) *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**: 123-164
7. Graves PR, Roach PJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 21689-21694
8. Gross SD, Anderson RA (1998) *Cell Signal* **19**: 699-711
9. Wojda I, Cytryńska M, Jakubowicz T (1996) *J Basic Microbiol* **36**: 363-369
10. Agostinis P, Vandendee JR., Goris J, Meggio F, Pinna LA, Marlevede W (1987) *FEBS Lett* **224**: 385-390
11. Flotow H, Roach PJ (1989) *J Biol Chem* **264**: 9126-9128
12. Cegielska A, Virshup DM (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1202-1211
13. Cegielska A, Moarefi I, Fanning E, Virshup DM (1994) *J Virol* **68**: 269-275
14. Brockman JL, Gross SD, Sussman MR, Anderson RA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9454-9458
15. Flotow H, Graves PR, Wang A, Fiol CJ, Roeske RW, Roach P (1990) *J Biol Chem* **265**: 14264-14269
16. Gross SD, Simerly C, Schatten G, Anderson RA (1997) *J Cell Sci* **110**: 3083-3090
17. Rowles J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9548-9552
18. Gross SD, Loijens JC, Anderson RA (1999) *J Cell Sci* **112**: 2647-1645
19. Zhai L, Graves PR, Robinson LC, Italiano M, Culbertson MR., Rowles J, Cobb MH, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 12717-12724
20. Graves PR, Haas DW, Hagedorn CH, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 6394-6401
21. Kusuda J, Hidari N, Hirai M, Hashimoto K (1996) *Genomics* **32**, 140-143
22. Fish KJ, Cegielska A, Getman ME, Landes GM, Virshup DM (1995) *J Biol Chem* **270**: 14875-14883
23. Ho Y, Mason S, Kobayashi R, Hoekstra M, Andrews B (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 581-586
24. Panek HR, Stepp JD, Engle HM, Marks KM, Tan PK, Lemmon SK, Robinson LC (1997) *EMBO J* **16**: 4194-4204

25. Robinson LC, Hubboard EJA, Graves PR, DePaoli-Roach AA, Roach PJ, Kung C, Haas DW, Hagedorn CH, Goebl M, Culbertson MR, Carlson M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 28-32
26. Robinson LC, Menold MM, Garrett S, Culbertson MR (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 2870-2881
27. DeMaggio AJ, Lindberg RA, Hunter T, Hoekstra MF (1992) *Proc Natl Acad Sci* USA **89**: 7008-7012
28. Wang X, Hoekstra MF, DeMaggio AJ, Dhillon N, Vancura A, Kuret J, Johnston GC, Singer RA (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 5375-5385
29. Kearney PH, Ebert M, Kuret J (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **203:** 231-236
30. Wang P-C, Vancura A, Desai A, Carmel G, Kuret J (1994) *J Biol Chem* **269**: 12014-12023
31. Kitamura K, Yamashita I (1998) *Gene* **214**: 131-137
32. Vancura A, Sessler A, Leichus B, Kuret J (1994) *J Biol Chem* **269**: 19271-19278
33. Longenecker KL, Roach PJ, Hurley TD (1996) *J Mol Biol* **257**, 618-631
34. Xu R, Carmel G, Sweet RM, Kuret J, Cheng X (1995) *EMBO J* **14**, 1015-1023
35. Hoekstra MF, Dhillon N, Carmel G, DeMaggio AJ, Lindberg RA, Hunter T, Kuret J (1994) *Mol Biol Cell* **5**: 877-886
36. Kemp BE, Pearson RB (1990) *TIBS* **15**: 342-346
37. Meggio F, Donella DA, Pinna LA (1979) *FEBS Lett* **106**, 76-80
38. Tuazon PT, Bingham EW, Traugh JA (1979) *Eur J Biochem* **94**: 497-504
39. Lu P-W, Tao M (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **139**: 855-860
40. Neiman AM, Stevenson BJ, Xu H-P, Sprague CF, Jr Herskowitz I, Wigler M, Marcus S (1993) *Mol Biol Cell* **4**: 107-120
41. Zhou Z, Gartner A, Cade R, Ammerer G, Errede B (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 2069-2080
42. Chain D, Korc-Grodzicki B, Kreizman T, Shaltiel S (1990) *FEBS Lett* **269:** 221-225
43. Meggio F, Donella-Deana A, Pinna LA (1983) *Biochem Int* **6**: 427-432
44. George CX, Thomis DC, McCormack SJ, Svahn CM, Samuel CE (1996) *Virology* **221**: 180-188
45. Patel RC, Stanton P, Sen GC (1994) *J Biol Chem* **269**: 18593-18598
46. Gao G, Goldford M (1995) *EMBO J* **14**: 2183-2190
47. Pukac LA, Carter JE, Ottlinger ME, Karnovsky MJ (1997) *J Cell Physiol* **172**: 69-78
48. Wojda I, Frajnt M, Jakubowicz T (1997) *J Basic Microbiol* **37**: 371-377
49. Wojda I, Cytryńska M, Frajnt M, Jakubowicz T (1999) *Acta Biochim Polon* **46**: 211-215
50. Cegielska A, Gietzen KF, Rivers A, Virshup DM (1998) *J Biol Chem 273*: 1357-1364
51. Brockman JL, Anderson RA (1991) *J Biol Chem* **266**: 2508-2512

Kinaza białkowa CKII

Protein kinase CKII

IWONA WOJDA*

Spis treści:

Contens:

Wykaz stosowanych skrótów: CKII — kinaza białkowa CKII (CK — skrót od nazwy zwyczajowej, ang. *casein kinase*); ATP — adenozyno-5'- trifosforan; GTP — guanozyno-5'-trifosforan; PKA — kinaza zależna od cAMP, mRNA — informacyjny RNA; eIF — eukariotyczny czynnik inicjacyjny translacji; D — kwas asparaginowy; E — kwas glutaminowy; p — reszta kwasu fosforowego; S (Ser) — seryna, T (Tre) — treoniona; X — dowolny aminokwas; Y — (Tyr) tyrozyna.

I. Ogólna charakterystyka

Kinaza białkowa CKII jest jedną z kinaz serynowo/treoninowych, niezależnych od cyklicznych nukleotydów.

Badania genetyczne wykazały, że CKII jest niezbędna dla przeżywalności komórek *Saccharomyces cerevisiae,* [1], *Schizosaccharomyces pombe* [2], *Dictyostelium discoideum* [3]. Aktywność CKII hamowana jest *in vitro* przez polianiony takie jak: kwas poliglutaminowy, kwas poliasparaginowy, a przede wszystkim heparynę, stymulowana zaś przez poliaminy takie jak spermina oraz zasadowe białka takie jak polilizyna czy protamina. Enzym ten jest niewrażliwy na działanie staurosporyny, związku hamującego aktywność wielu kinaz białkowych. CKII wykorzystuje zarówno ATP jak i GTP jako źródła reszt fosforanowych [4-7].

Lista białek fosforylowanych przez CKII wzrasta bardzo szybko. W roku 1980 znane były jedynie 3 substraty, do roku 1990 liczba znanych białek fosforylowanych przez CKII wzrosła do 35, a do 1993 roku, do 99 białek [4]. Obecnie lista przypuszczalnych substratów tego enzymu zawiera około 200 białek, wśród których znajdują się kluczowe enzymy niektórych szlaków metabolicznych (syntaza glikogenu, dekarboksylaza ornityny); receptory (receptor insuliny, receptor IGF-II); białka uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w komórce (podjednostka R_{II} PKA, kalmodulina, inhibitor-2 fosfataz); czynniki transkrypcyjne (c-Myc, c-Myb); białka supresorowe nowotworów (p53); enzymy jądrowe (polimeraza I i II RNA, topoizomeraza DNA I i II); czynniki translacji (eIF3, eIF5) oraz białka cytoszkieletu (klatryna, spektryna) [8]. Dosyć niezwykłą cechą kinazy CKII jest jej zdolność do tworzenia stabilnych kompleksów z wieloma substratami [9, 10]. Wiadomo, że CKII z *S. cerevisiae* tworzy kompleks z topoizomerazą II [11] oraz białkiem Srp40 [12]. Fizjologiczna rola takich kompleksów nie jest jeszcze poznana.

Kinaza białkowa CKII rozpoznaje resztę serynową czy treoninową w fosforylowanym białku w sekwencji **S/T**-X-X-D/E/Sp/Tp/Yp. W pozycji +3 w stosunku do fosforylowanego miejsca musi znajdować się aminokwas o charakterze kwaśnym lub uprzednio ufosforylowana seryna, treonina lub tyrozyna. Jednak większa liczba kwaśnych aminokwasów wokół miejsca fosforylacji zwiększa jej wydajność [4, 6, 7, 13].

Ostatnio w literaturze pojawiły się doniesienia, że CKII uważana dotąd za klasyczną kinazę serynowo/treoninową, podobnie jak CKI może również fosforylować reszty tyrozynowe. Wykazano, że CKII z drożdży *Yarrowia lipolytica*, w obecności jonów Mg^{++} ulega autofosforylacji w resztach serynowych i treoninowych. W obecności jonów Mn^{++} autofosforylacja w resztach serynowych i treoninowych jest znacznie mniejsza, wzrasta natomiast poziom auto-

*Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

fosforylacji enzymu w resztach tyrozynowych [14]. Podobne wyniki uzyskano używając kazeiny jako substratu. Tak więc obecność jonów Mn^{++}zmienia CKII w kinazę białkową o podwójnej specyficzności.

Kolejne doniesienie o zdolności CKII do fosforylacji białek w resztach tyrozynowych pochodzi z grupy kierowanej przez Martin (University of California, Berkeley) Wykazano, że jądrowe białko Fpr3 (ang. *immunophilin*) drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest fosforylowane w reszcie tyrozynowej (Tyr^{184}) przez oczyszczoną CKII z drożdży oraz rekombinacyjną CKII ludzką i z *Drosophila melanogaster.* Fosforylacja Tyr^{184} wymaga obecności fosfoseryny lub kwaśnego aminokwasu w pozycji +2 [15].

Zdolność CKII do fosforylacji białek w resztach tyrozynowych może mieć istotne znaczenie w komórkach drożdży, u których jak wiadomo nie ma typowych kinaz tyrozynowych.

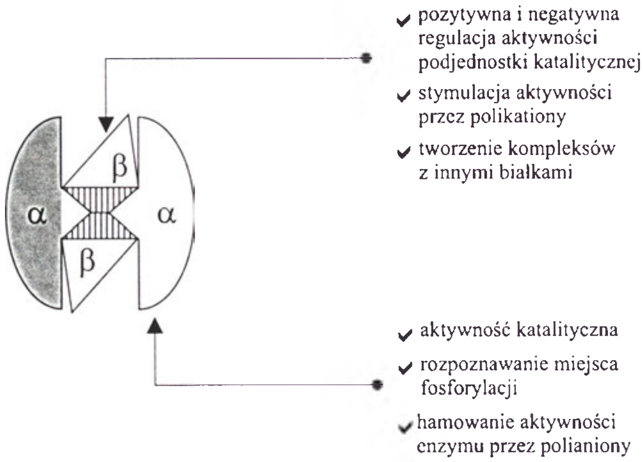
II. Struktura podjednostkowa i regulacja aktywności

Obecność kinazy CKII stwierdzono we wszystkich zbadanych dotąd organizmach eukariotycznych. W znacznej większości z nich enzym ten składa się z dwóch podjednostek katalitycznych (α lub α'), o masie od 35kDa do 44kDa (u *S.cerevisiae* są one kodowane przez geny *CKA1 i CKA2*) oraz dwóch podjednostek regulatorowych (β) o masie od 24kDa do 29kDa. U *Saccharomyces cerevisiae* wykazano obecność dwóch różnych podjednostek regulatorowych tj. β i β', kodowanych przez niezależne geny (*CKB1* i *CKB2*). Obecnośc dwóch różnych podjednostek regulatorowych wykazano także u *Arabidopsis thaliana* i *Candida albicans* [16, 17, 18].

Podjednostki β pełnią jak wcześniej wspomniano funkcję regulatorową. Zwiększają odporność enzymu na denaturację i w większości przypadków stymulują aktywność katalityczną podjednostek α.

Badania nad strukturą czwartorzędową CKII prowadzone były w kilku laboratoriach, z wykorzystaniem systemu dwuhybrydowego [19-21]. Wykazały one, że podjednostki β wchodzą we wzajemne interakcje, jak również w interakcje z podjednostkami α, podczas gdy podjednostki katalityczne oddziałują jedynie z podjednostkami β (nie zaobserwowano oddziaływań typu α–α). Ponadto badania wykazały, że dimery podjednostek β łatwiej wiążą podjednostki katalityczne niż ich formy monomeryczne [22]. Spostrzeżenie to nasuwa wniosek, że dimeryzacja podjednostek β poprzedza przyłączenie podjednostek katalitycznych. Może to oznaczać, że podjednostki α wymagają kontaktu z obydwiema podjednostkami regulatorowymi do prawidłowej asocjacji lub, że dimeryzacja podjednostek regulatorowych powoduje zmiany konformacyjne ułatwiające przyłączenie podjednostek katalitycznych.

Na podstawie powyższych informacji zaproponowano model budowy holoenzymu kinazy CKII przedstawiony na rycinie 1, według którego podjednostki β znajdują się wewnątrz tetrameru, tworząc tzw. rdzeń, natomiast podjednostki katalityczne zlokalizowane są na zewnątrz. Wykazano, że za interakcje β–β oraz β–α odpowiedzialny jest fragment C-końcowy podjednostki regulatorowej CKII (zakreślony trapez) [23].



Ryc. 1. Struktura podjednostkowa kinazy CKII, [6]-zmodyfikowane.

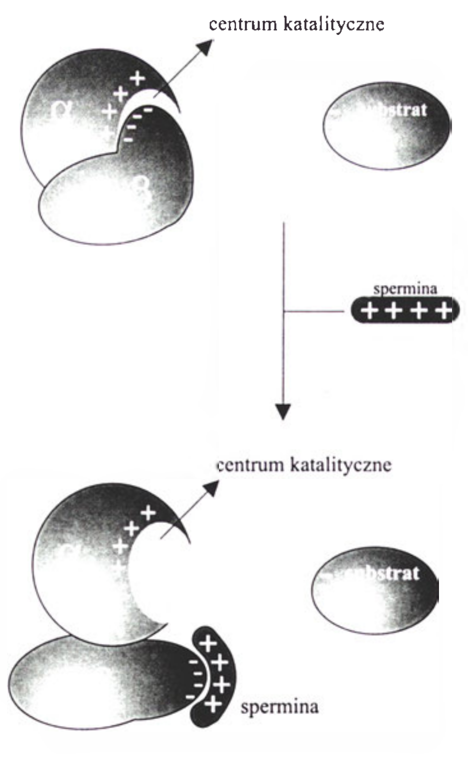
Doświadczenia z użyciem syntetycznych fragmentów podjednostki β wykazały, że fragment C-końcowy polipeptydu β stymuluje aktywność katalityczną podjednostki α oraz stabilizuje enzym (pozytywna kontrola), natomiast N-koniec pełni funkcję inhibitora (negatywna regulacja) [22, 24, 25].

Tak więc podjednostka regulatorowa kinazy CKII pełni podwójną funkcję. Z jednej strony zwiększa ona aktywność podjednostki katalitycznej, z drugiej zaś może również działać hamująco na jej aktywność. Hamujące działanie podjednostki β jest najbardziej widoczne w odniesieniu do takich substratów jak kalmodulina czy dekarboksylaza ornityny, których fosforylacja jest całkowicie hamowana w obecności podjednostki β. Holoenzym CKII może jednak fosforylować powyższe substraty w obecności białek o charakterze zasadowym takich jak: protamina, histon czy polilizyna [26, 27]. Na uwagę zasługuje fakt, że spermina, która jak wiadomo stymuluje aktywność kinazy CKII, może hamować fosforylację kalmoduliny w obecności białek zasadowych [28].

Powyższe wnioski dotyczące roli podjednostki β w regulacji aktywności enzymu, zdają się być potwierdzone przez wyniki badań z użyciem peptydowych substratów CKII. Wykazano, że poziom fosforylacji peptydu jest wypadkową pozytywnego i negatywnego działania podjednostek β na podjednostki α. W mutantach substytucyjnych, u których sekwencja aminokwasów w N-końcu podjednostki β kinazy CKII została zmieniona zaobserwowano hyperaktywację podjednostki α przez podjednostkę β, jak również brak hamującego wpływu podjednostki β na fosforylację kalmoduliny przez holoenzym CKII [27].

Aktywność kinazy CKII jest, jak wcześniej wspomniano, stymulowana przez poliaminy, szczególnie sperminę oraz zasadowe polipeptydy, np. polilizynę. Stymulacja aktywności CKII przez poliaminy jest najbardziej widoczna w odniesieniu do takich substratów jak kazeina czy czynnik transkrypcyjny MyoD i ma miejsce jedynie w obecności podjednostki β przy niskim stężeniu jonów Mg^{++}.

Nieznany jest jeszcze mechanizm regulacji aktywności CKII przez polikationy, niemniej jednak w literaturze pojawiają się próby jego wyjaśnienia. Na rycinie 2 przedstawiony jest model stymulacji aktywności kinazy CKII przez sperminę zaproponowany przez Leroy i wsp. [29, 30].



Ryc. 2. Model stymulacji aktywności kinazy CKII przez sperminę wg Leroy i wsp. [30]– zmodyfikowane, objaśnienia w tekście.

Struktura holoenzymu CKII jest stabilizowana przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami w centrum katalitycznym podjednostki α, a ujemnymi ładunkami podjednostki β, znajdującymi się w części N-końcowej polipeptydu. Taka „zamknięta" konformacja holoenzymu, stabilna przy 1mM stężeniu jonów Mg^{++}, ogranicza dostęp substratów do centrum katalitycznego enzymu. Spermina, jak twierdzi Leroy przyłącza się do miejsca wiążącego poliaminy znajdującego się jak wcześniej wspomniano w N–końcu podjednostki regulatorowej. Powoduje to odsłonięcie centrum katalitycznego enzymu. CKII przybiera konformację „otwartą" i centrum katalityczne staje się bardziej dostępne dla substratu.

W ostatnich latach wzrosła liczba poznanych białek zdolnych do interakcji z podjednostką β kinazy CKII. Przypuszcza się, że niektóre z tych białek dzięki obecności w strukturze pierwszorzędowej szeregu aminokwasów o charakterze zasadowym mogą „naśladować" działanie polilizyny. Ma to miejsce w przypadku fosforylacji białka Mdm2 przez CKII. Białko Mdm2 jest inhibitorem białka p53. Fosforylacja Mdm2, podobnie jak fosforylacja kalmoduliny jest hamowana przez podjednostkę regulatorową CKII. Wykazano, że fosforylacja białka Mdm2 przez kinazę CKII jest stymulowana przez koniec C białka p53, naśladujący działanie polilizyny [31].

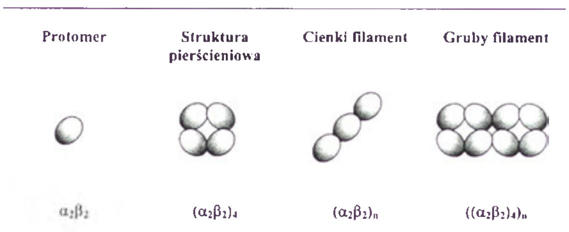
U drożdży *S. pombe* dysrupcja genu kodującego podjednostkę β CKII powoduje znaczny spadek aktywności CKII. W tym przypadku aktywność podjednostki katalitycznej CKII jest bardzo niska i podjednostka β jest niezbędna do uzyskania dostatecznej dla prawidłowego funkcjonowania komórek aktywności enzymu. Warto tu zaznaczyć, że u *S. pombe* sekwencja kwaśnych aminokwasów w N-końcu podjednostki β, odpowiedzialnych za hamowanie aktywności podjednostki katalitycznej nie jest tak dobrze zachowana. Sugeruje to, że u tego gatunku drożdży funkcją podjednostek β jest jedynie stymulacja aktywności podjednostek katalitycznych [cyt za 6].

Z literatury wiadomo, że u niektórych organizmów takich jak *Zea mays* czy *Dictyostelium* istnieją monomeryczne formy CKII, odpowiadające podjednostce α [32, 33].

Dotychczas brak jest przekonywujących dowodów dotyczących regulacji aktywności CKII przez fosforylację. Podjednostka β jest fosforylowana przez podjednostkę katalityczną CKII w N-końcu (Ser^2 i / lub Ser^3) [34]. Wykazano, że autofosforylacja CKII powoduje niewielki spadek aktywności enzymu [35] jak również, że aktywność CKII *in vitro* jest większa w obecności fosfataz, które prawdopodobnie utrzymują enzym w formie zdefosforylowanej [36]. Z drugiej strony na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych pojawiały się prace su-

gerujące, że fosforylacja CKII jest skorelowana ze wzrostem aktywności tego enzymu w odpowiedzi komórki na czynniki wzrostowe, surowicę czy hormony [cyt. za 37].

Wykazano, że holoenzymy CKII w warunkach *in vitro* mają zdolność do tworzenia oligo- i polimerów. Przy wysokim stężeniu soli (0,5 M), CKII występuje w postaci protomerów o średnicy około 18 nm, odpowiadających pojedyńczym holoenzymom składającym się z dwóch podjednostek regulatorowych i dwóch podjednostek katalitycznych ($\alpha_2\beta_2$). Przy niższym stężeniu soli, rzędu 0,2 M NaCl, protomery CKII asocjują ze sobą tworząc struktury pierścieniowe o średnicy około 36 nm. W skład pojedyńczego pierścienia wchodzą 4 protomery enzymu [$(\alpha_2\beta_2)_4$]. Jeśli stężenie soli zostanie obniżone do 0,1 M NaCl kinaza CKII występuje jako mieszanina proto-, oligo- i polimerów. Poza wyżej wspomnianymi strukturami pojawiają się dodatkowo tzw. cienkie i grube filamenty. Filamenty cienkie powstają prawdopodobnie poprzez liniową asocjację protomerów CKII [$(\alpha_2\beta_2)_n$]. Mają one długość od 1 do 5 μm. Filamenty grube są krótsze i powstają dzięki liniowej asocjacji struktur pierścieniowych CKII [$((\alpha_2\beta_2)_4)_n$] [38]. Poszczególne formy w jakich kinaza CKII może występować w zależności od siły jonowej środowiska przedstawia rycina 3.



Ryc. 3. Struktura czwartorzędowa kinazy białkowej CKII [38] — zmodyfikowane.

Badania *in vitro* wykazały, że w optymalnych warunkach katalizy, tj. przy wysycającym stężeniu substratów i kofaktorów kinaza białkowa CKII przybiera formę struktur pierścieniowych. Takie kofaktory jak jony Mg^{++} czy bardzo niskie stężenia sperminy stabilizują struktury pierścieniowe, nie dopuszczając do utworzenia nieaktywnych protomerów czy filamentów. Wysokie, hamujące aktywność enzymu stężenia soli, powodują dysocjację aktywnych struktur pierścieniowych do protomerów. Powyższe obserwacje sugerują ścisłą korelację pomiędzy konformacją enzymu, a jego aktywnością i wydają się potwiedzać sugestie o allosterycznej regulacji aktywności CKII [cyt. za 39].

W dalszym ciągu jednak pozostaje do wyjaśnienia czy wyżej wspomniane struktury CKII występują *in vivo*, a jeżeli tak, to jaka jest ich fizjologiczna funkcja.

Pomimo ogromnej ilości badań nad regulacją aktywności CKII, specyficzne inhibitory tego enzymu nie są dokładnie poznane. Powszechnie znany jest wpływ heparyny na aktywność CKII. Podjęto również próby chemicznej syntezy inhibitorów CKII. Większość z nich to pochodne benzimidazolu takie jak: 5,6-DiCl-RB (5,6-dichloro-1-β-D-rybofuranozyl benzymidazolowy-DRB), 5,6-DiBr-RB (5,6-dibromo-1-β-D-rybofuranozyl benzymidazolowy) czy 4-Cl-DRB (4,5,6-trichloro-1-β-D-rybofuranozyl benzymidazolowy) i inne [40, 41].

Powyższe informacje wskazują, że dalsze badania nad mechanizmem regulacji aktywności CKII, a w szczególności nad poszukiwaniem specyficznych inhibitorów tego enzymu mogą w przyszłości mieć istotne znaczenie w terapii wielu chorób, szczególnie chorób nowotworowych.

III. Funkcja CKII w komórce

Fizjologiczna rola kinazy CKII w komórce nie jest jeszcze dokładnie poznana. Mnogość potencjalnych substratów wskazuje, że kinaza ta jest enzymem wielofunkcyjnym, zaangażowanym w wiele procesów komórkowych. Aktywność kinazy białkowej CKII jest bardzo duża w komórkach szybkodzielących się zarówno prawidłowych jak i po transformacji nowotworowej. Zaobserwowano również wzrost aktywności CKII w odpowiedzi na stymulację komórek mitogenami.

Wyniki prowadzonych od wielu lat badań nad rolą CKII u *Saccharomyces cerevisiae* pozwoliły wyodrębnić cztery główne procesy, w które enzym ten jest zaangażowany. Są to: regulacja ekspresji genów, cykl komórkowy, polarność komórki oraz homeostaza [cyt. za 4].

Wykazano, że aktywność kinazy CKII jest istotna w transkrypcji genów zależnych od polimerazy III zarówno *iv vivo* jak i *in vitro*. W ekstraktach drożdży *S. cerevisiae* u których zinaktywowano gen *CKA2*, kodujący podjednostkę α' kinazy CKII (ang. *gene disruption*) wykazano znacznie niższy poziom transkrypcji genów dla tRNA i 5S rRNA w porównaniu z ekstraktami z komórek kontrolnych. Prawidłowy poziom transkrypcji tych genów uzyskano po dodaniu do ekstraktu kinazy CKII oczyszczonej z drożdży *S. cerevisiae* [4].

Kinaza białkowa CKII reguluje również ekspresję flokulin, białek zewnątrzkomórkowych wiążących

się do glikoprotein ściany komórkowej *S. cerevisiae* [cyt. za 4].

Wyniki prowadzonych badań nad udziałem CKII w regulacji cyklu komórkowego u drożdży wykazały, że enzym ten jest niezbędny w fazie G_1 oraz w fazie G_2 lub/i M [42].

W komórkach ssaków, mikroiniekcja przeciwciał skierowanych przeciw podjednostce β CKII powoduje zahamowanie cyklu komórkowego w kilku miejscach fazy G_1 tj. G_0/G_1, we wczesnej fazie G_1 oraz w G_1/S [43].

Nie wiadomo jednak, które białka niezbędne do przejścia komórki przez fazę G_1 cyklu komórkowego są fizjologicznymi substratami CKII. Wykazano, że u wyższych Eukaryota enzym ten *in vitro* fosforyluje Ser^{39} w białku Cdc2. Warto zaznaczyć, że kinaza Cdc2 jest również fosforylowana *in vivo* w tej samej pozycji w fazie G_1 cyklu komórkowego [44].

Przypuszcza się że w fazie G_2/M fizjologicznym substratem CKII jest topoizomeraza II. Enzym ten jest niezbędny do prawidłowego przebiegu kondensacji chromatyny w metafazie oraz do rozdziału siostrzanych chromatyd w anafazie [42]. Wykazano, że u *S. cerevisiae* fosforylacja topoizomerazy II przez CKII *in vitro* znacznie stymuluje aktywność enzymu. Jednocześnie udowodniono, że topoizomeraza II, która jest fosforylowana *in vivo*, ulega hyperfosforylacji podczas mitozy [45].

Kinaza białkowa CKII bierze również udział w utrzymaniu polarności komórki. Ponieważ mutanty *S. cerevisiae* $CKA1^{ts}$ (ang. *temperature sensitive*) w temperaturze restrykcyjnej wykazują nieco inny fenotyp niż mutanty $CKA2^{ts}$ niektórzy uczeni sugerują funkcjonalną specjalizację podjednostek α i α' u tego gatunku drożdży [46, 47].

Wykazano, że u *Saccharomyces cerevisiae* kinaza CKII odgrywa istotną rolę w regulacji odporności komórki na wysokie stężenie soli. Komórki drożdży u których zinaktywowano gen kodujący podjednostkę β charakteryzowały się wrażliwością na wysokie stężenie Na^+ i Li^+ [16]. Przypuszcza się, że CKII fosforyluje, a tym samym aktywuje białko(a) odpowiedzialne za indukcję genu *ENA1* w odpowiedzi komórki na wysokie stężenie soli. Możliwe jest również, że enzym ten inaktywuje inhibitor ekspresji genów *ENA*. Białka kodowane przez geny *ENA 1-4* tworzą tzw. „pompę" sodową, odpowiadającą za transport jonów Na^+ na zewnątrz komórki i są indukowane w odpowiedzi na wysokie stężenie soli [4].

Wykazano, że aktywność/ilość kinazy białkowej CKII jest znacznie większa w komórkach nowotworowych, np. w 50% nowotworów nerek zaobserwowano nadmiar podjednostki regulatorowej CKII [48]. Wykazano również, że nadekspresja podjednostki α u myszy transgenicznych prowadzi do leukemii [49]. Ponadto CKII jest enzymem fosforylującym wiele białek kodowanych przez genom wirusów takich jak HIV (białka VPU i Rev), VSV, cytomegalowirus, co sugeruje, że CKII komórek gospodarza jest zaangażowana w przebieg infekcji wirusowej [8].

IV. Podsumowanie

Historia badań nad kinazą białkową CKII liczy już sobie kilkadziesiąt lat. Wiadomo, że jest to enzym wielofunkcyjny, modyfikujący wiele białek, które biorą udział w takich procesach jak: nowotworzenie, kontrola ekspresji genów, cykl komórkowy czy apoptoza.

CKII jest w większości przypadków białkiem oligomerycznym składającym się z podjednostek katalitycznych i regulatorowych, które asocjują ze sobą tworząc natywny holoenzym. Podjednostki regulatorowe modulują aktywność podjednostek katalitycznych, decydują o lokalizacji subkomórkowej enzymu oraz umożliwiają tworzenie kompleksu w różnymi białkami.

W ostatnich latach wzrasta liczba dowodów, że poszczególne podjednostki CKII mogą istnieć w komórce niezależnie od siebie [cyt. za 50]. Jaka jest rola poszczególnych polipeptydów α i β w komórce pozostaje do wyjaśnienia.

Podziękowanie

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Teresie Jakubowicz za cenne uwagi i rady w czasie przygotowywania niniejszego artykułu.

Artykuł otrzymano 4 listopada 1999 r.
Zaakceptowano do druku 2 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Padmanabha R, Chen-Wu JLP, Hanna DE, Glover CVC (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 4089-4099
2. Snell V, Nurse P (1994) *EMBO J* **13**: 2066-2074
3. Kikkawa U, Mann SKO, Firtel RA, Hunter T (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 5711-5723
4. Glover CVC (1998) *Prog Nuc Acid Res* **59**: 95-133
5. Pinna LA (1990) *Biochim Biophys Acta* **1054**: 267-284
6. Pinna LA, Meggio F (1997) *Prog Cell Cycle Res* **3**: 77-97
7. Tuazon PT, Traugh JA (1991) *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**: 123-164
8. Pinna LA (1997) *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 551-554
9. Li D, Dobrowolska G, Krebs EG (1996) *J Biol Chem* **271**: 15662-15668
10. Miyata Y, Yahara I (1995) *Biochemistry* **34**: 8123-8129

11. Cardenas ME., Walter R, Hanna D, Gasser SM (1993) *J Cell Sci* **104**: 533-543
12. Meier UT (1996) *J Biol Chem* **271**: 19376
13. Kemp BE, Pearson RB (1990) *TIBS* **15**: 342-346
14. Chardot T, Shen H, Meunier JC (1995) *C R Acad Sci* (Paris) **318**: 937-942
15. Wilson LK, Dhillon N, Thorner J, Martin GS (1997) *J Biol Chem* **272**: 12961-12967
16. Bidwai AP, Reed JC, Glover CVC (1995) *J Biol Chem* **270**: 10395-10404
17. Collinge MA, Walker JC (1994) *Plant Mol Biol* **25**: 649-658
18. Walz K, Pardo PS, Passeron S (1997) *Arch Biochem Biophys* **340**: 347-354
19. Boldyreff B, Issinger OG (1997) *FEBS Lett* **403**: 197-199
20. Gietz D, Graham KC, Litchwield DW (1995) *J Biol Chem* **270**: 13017-13021
21. Kusk M, Bendixen C, Duno M, Wertergaard O, Thomsen B (1995) *J Mol Biol* **253**: 703-711
22. Marin O, Meggio F, Sarno S, Pinna LA (1997) *Biochemistry* **36**: 7192-7198
23. Litchefield DW, Slomski E, Lewenza S, Narvey M, Bosc DG, Gietz RD (1996) *Biochem Cell Biol* **74**: 541-547
24. Sarno S, Vaglio P, Marin O, Issinger OG, Ruffato K, Pinna LA (1997) *Biochemistry* **36**: 11717-11724
25. Sarno S, Vaglio P, Marin O, Meggio F, Issinger OG, Pinna LA (1997) *Eur J Biochem* **248**: 290-295
26. Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Marchiori F, Perich JW, Issinger OG, Pinna LA (1992) *Eur J Biochem* **205**: 939-945
27. Meggio F, Boldyreff B, Issinger OG, Pinna L A (1994) *Biochemistry* **33**: 4336-4342
28. Sarno S, Marin O, Meggio F, Pinna LA (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **194**: 83-90
29. Leroy D, Schmid N, Behr JP, Filhol O, Pares S, Garin J, Bourgarit JJ, Chambaz EM, Cochet C (1995) *J Biol Chem* **270**: 17400-17406
30. Leroy D, Heriché JK, Filhol O, Chambaz EM, Cochet C (1997) *J Biol Chem* **272**: 20820-20827
31. Guerra B, Götz C, Wagner P, Montenarh M, Issinger OG (1997) *Oncogene* **14**: 2683-2688
32. Dobrowolska G, Meggio F, Szczegielniak J, Muszyńska G, Pinna LA (1992) *Eur J Biochem* **204**: 299-303
33. Ospina B, Nunez A, Fernandez-Renart M (1992) *Mol Cell Biochem* **118**: 49-60
34. Meggio F, Pinna LA (1984) *Eur J Biochem* **145**: 593-599
35. Lin WJ, Sheu GT, Traugh JA (1994) *Biochemistry* **33**: 6998-7004
36. Agostinis P, Goris J, Pinna LA, Marlevede W (1992) *Biochem J* **248**: 785-789
37. Litchfield DW, Dobrowolska G, Krebs EG (1994) *Cell Mol Biol Res* **40**: 373-381
38. Valero E, De Bonis S, Filhol O, Wade RH, Langowski J, Chambaz EM, Cochet C (1995) *J Biol Chem* **270**, 8345-8352
39. Valero E, Chambaz EM, Cochet C (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 178-182
40. Shugar D (1995) *Acta Biochim Polon* **42**: 405-418
41. Shugar D (1995) *Pharmacol Ther* **82**: 315 - 335
42. Hanna DE, Rethinaswamy A, Glover CVC (1995) *J Biol Chem* **270**: 25905-25914
43. Pepperkok R, Lorenz P, Ansorge W, Pyerin W (1994) *J Biol Chem* **269**: 6986-6991
44. Russo GL, Vandenberg MT, Yu IJ, Bae YS, Franza BR, Jr. Marshak DR (1992) *J Biol Chem* **267**, 20317-20325
45. Cardenas M, Dang Q, Glover CVC, Gasser SM (1992) *EMBO J* **11**: 1785-1796
46. Bodenbach L, Fauss J, Robitzki A, Krehan A, Lorenz P, Lozeman FJ, PyerinW (1994) *Eur J Bioch* **220**: 263-273
47. Rethinaswamy A, Birnbaum MJ, Glover CVC (1998) *J Biol Chem* **273**: 5869-5877
48. Issinger OG (1993) *Pharmacol Ther* **59**: 1-30
49. Seldin DC, Leder P (1995) *Science* **267**: 894 – 897
50. Guerra B, Issinger OG (1999) *Electrophoresis* **20**: 391-408

Dehydrogenaza NADH kompleksu I łańcucha oddechowego. Podstawowe podjednostki kodowane przez genom jądrowy

Complex I NADH-dehydrogenase of the respiratory chain. The basic subunits encoded by a nuclear genome

DOROTA PIĘKNA*

Spis treści:

Contents:

Wykaz stosowanych skrótów: NADH — dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać zredukowana); NADPH — fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (postać zredukowana); FMN — mononukleotyd flawinowy (postać utleniona); FAD — dinukleotyd flawinoadeninowy (postać utleniona); ATP — adenozynotrifosforan; ND — nazwa podjednostek kompleksu I zwierząt i grzybów kodowanych przez genom mitochondrialny; *nad* — mitochondrialne geny podjednostek NAD kompleksu I roślin; NAD — nazwa podjednostek kompleksu I roślin kodowanych przez genom mitochondrialny; *nuo* — geny podjednostek kompleksu I *E.coli*; Nuo — nazwa podjednostek kompleksu I *E. coli*; NUO — nazwa podjednostek kompleksu I *N. crassa*; *ndh* — chloroplastowe geny podjednostek dehydrogenazy NAD(P)H; NDH — nazwa podjednostek chloroplastowej dehydrogenazy NAD(P)H; [^{3}H]TDP — (ang.) (*trifluoromethyl*) *diazirinyl pyridaben*; SDS/PAGE — elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z SDS; EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny (spinowy); Em — potencjał wyrażany w mV

I. Wstęp

Mitochondria określa się jako siłownie komórki, gdyż zachodzą w nich procesy prowadzące do wytworzenia energii. Obecność w mitochondriach dwóch systemów błonowych tj. błony wewnętrznej i zewnętrznej, spowodowała pojawienie się dwóch przedziałów: matriks mitochondrialnej i przestrzeni międzybłonowej. Tym samym w mitochondriach utworzone zostały odpowiednie warunki do przebiegu różnych procesów związanych z uzyskiwaniem energii w postaci ATP.

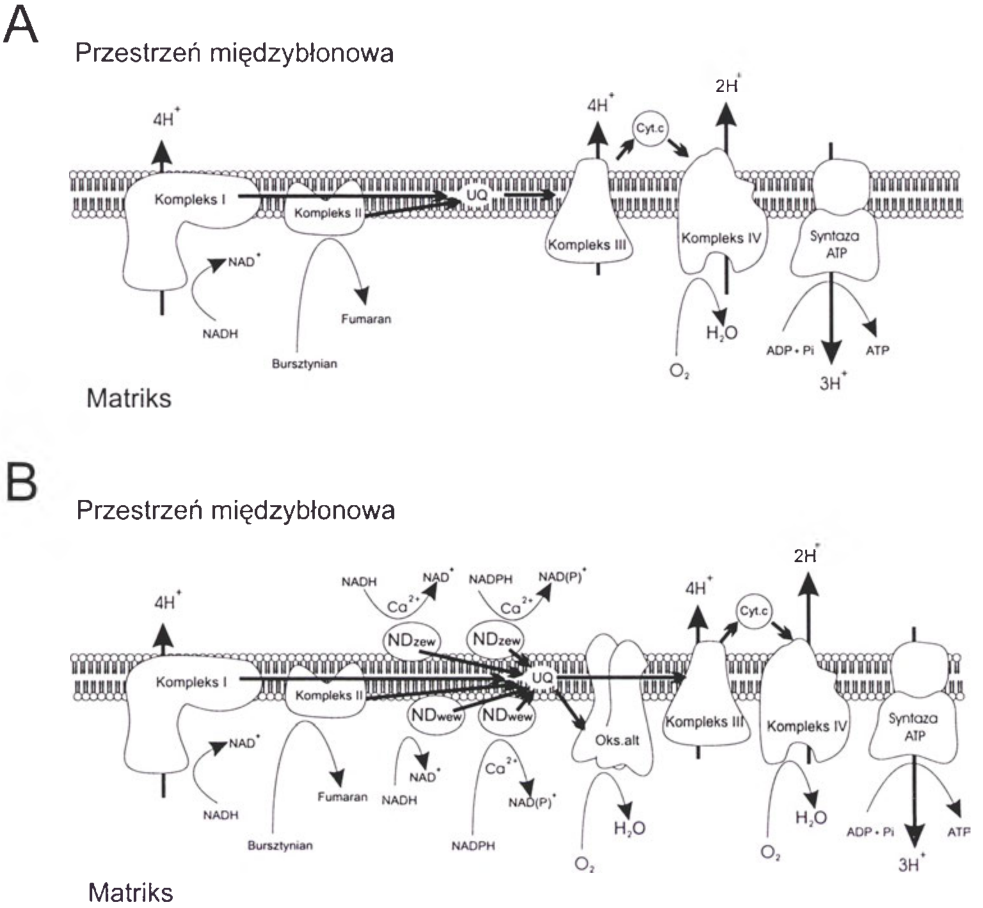
Fosforylacja oksydacyjna zachodząca przy udziale łańcucha oddechowego to końcowy szlak ogólnego procesu zmierzającego do uzyskania energii z prostych związków organicznych.

Sekwencję nośników elektronów w łańcuchu mitochondrialnym ustalono w znacznej mierze w latach sześćdziesiątych dzięki zastosowaniu elektrody tlenowej i technik spektroskopowych. W skład łańcucha oddechowego rozmieszczonego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, wchodzą cztery kompleksy enzymatyczne znane jako oksydoreduktaza NADH-ubichinon (kompleks I, E.C.1.6.99.3), oksydoreduktaza bursztynian-ubichinon (kompleks II, E.C.1.3.99.1), oksydoreduktaza ubichinol-cytochrom c (kompleks III, E.C.1.10.2.2.) i oksydaza cytochromu c (kompleks IV, E.C.1.9.9.1.). Podstawową funkcją łańcucha oddechowego jest przenoszenie elektronów od pary NAD^+/NADH do pary O_2/$2H_2O$. Drugą ważną funkcją jest translokacja protonów w poprzek błony z matriks mitochondrialnej

*Mgr, Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, UAM, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

do przestrzeni międzybłonowej. Przy udziale trzech pomp protonowych wytwarzany jest gradient protonowy, który dostarcza energii do syntezy ATP.

Elektrony z kompleksu I są przenoszone poprzez zredukowaną formę ubichinonu do kompleksu III i następnie do kompleksu IV. Na pulę ubichinonu elektrony przenoszone są jedną drogą: z NADH na tlen. Dodatkowe cztery dehydrogenazy NAD(P)H są zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej; dwie są skierowane w stronę matriks a pozostałe dwie w stronę cytozolu (Ryc. 1). Fakt występowania u roślin kilku dehydrogenaz utrudnia niewątpliwie



Ryc. 1. A. Droga transportu elektronów w łańcuchu oddechowym. B. Schemat rozgałęzienia łańcucha oddechowego roślin. Dehydrogenaza NAD(P)H niewrażliwa na rotenon skierowana w stronę matriks – ND_{wew}, dehydrogenaza NAD(P)H niewrażliwa na rotenon skierowana w stronę przestrzeni międzybłonowej – ND_{zew}, ubichinon — UQ, oksydaza alternatywna – Oks.alt, cytochrom *c* – Cyt. *c*. Wg Rasmusson i wsp. [10] (zmieniono).

elektrony dostarczane są również z $FADH_2$ przy udziale dehydrogenazy bursztynianowej (kompleks II). Kompleks II, w przeciwieństwie do pozostałych kompleksów, nie jest pompą protonową. Transport elektronów w łancuchu oddechowym jest możliwy dzięki różnicy potencjałów między NADH a O_2, która wynosi 1,1 V.

W przeciwieństwie do innych eukariontów mitochondrialny łańcuch oddechowy roślin jest o wiele bardziej rozbudowany. Oprócz podstawowych składników łańcucha oddechowego, u roślin występują dodatkowo cztery niewrażliwe na rotenon dehydrogenazy NAD(P)H i alternatywna oksydaza. Żaden z dodatkowych składników roślinnego łańcucha oddechowego nie pompuje protonów w poprzek błony [1, 2]. U roślin istnieje więc kilka dróg, którymi może być transportowany elektron, podczas gdy u ssaków badanie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym.

Donorem elektronów dla pierwszego ogniwa łańcucha oddechowego – dehydrogenazy NADH są cząsteczki NADH zawierające pary elektronów o wysokim potencjale energetycznym. Dehydrogenaza NADH – kompleks I jest największym wielopodjednostkowym kompleksem enzymatycznym, w obrębie którego istnieje szereg centrów oksydoredukcyjnych jak FMN i centra Fe-S, poprzez które przenoszone są elektrony z NADH na kolejny akceptor – ubichinon i następnie do kompleksów III i IV.

II. Minimalny kompleks I

Oksydoreduktaza NADH-ubichinon zwana dalej dehydrogenazą NADH jest najbardziej skompliko-

wanym i najmniej poznanym enzymem wśród kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Dzięki badaniom przeprowadzonym z organizmami bakteryjnymi, możliwe było lepsze poznanie kompleksu I wyższych organizmów. Szczególnie intensywnie prowadzone są badania kompleksu I z *Neurospora crassa* i kompleksu I wyizolowanego z mitochondriów serca wołu (*Bos taurus*) [3, 4]. Zdecydowanie słabiej poznano dehydrogenazę NADH wrażliwą na rotenon roślin. Istnieją jednak pewne cechy tego wielopodjednostkowego kompleksu enzymatycznego, które są wspólne dla wszystkich królestw (bakterie, grzyby, rośliny, zwierzęta). Te cechy to: występowanie 14 podstawowych podjednostek, które tworzą „minimalny" aktywny kompleks, wyraźna homologia podjednostek „minimalnego" kompleksu między gatunkami różnych królestw, obecność grup związanych z przebiegiem procesów oksydoredukcyjnych (FMN i centra Fe-S) (Tab. 1).

Tabela.1.

Geny podstawowych podjednostek kompleksu I występujące w genomie jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym u roślin. U roślin dwie podjednostki są kodowane przez genom mitochondrialny (Mit.), podczas gdy u ssaków podjednostki te są kodowane przez genom jądrowy (Jąd.). Z 14 podjednostek „minimalnego" kompleksu bakterii (geny *nuo* u *E. coli*) 11 jest homologicznych do podjednostek występujących u roślin w chloroplastach (Chl.:geny *ndh*). Dla podjednostki (24kDa) *Arabidopsis thaliana* masę cząsteczkową określono na podstawie cDNA. Wg Rasmusson i wsp. [10] (zmieniono).

Rośliny wyższe			Ssaki		*E. coli*
Jąd.	**Mit.**	**Chl.**	**Mit.**	**Jąd.**	
	nad 1	ndh A	nd1		nuo H
	nad 2	ndh B	nd2		nuo N
	nad 3	ndh C	nd3		nuo A
	nad 4	ndh D	nd4		nuo M
	nad 4L	ndh E	nd4L		nuo K
	nad 5	ndh F	nd5		nuo L
	nad 6	ndh G	nd6		nuo J
	nad 7	ndh H		49kD	nuo D
28.5kD		ndh I		TYKY	nuo I
	nad 9	ndh J		30kD	nuo C
22kD		ndh K		PSST	nuo B
(24kD)				24kD	nuo E
55kD				51kD	nuo F
76kD				75kD	nuo G

U bakterii znane jest locus chromosomalne obejmujące 14 genów, które są homologiczne do podjednostek mitochondrialnego kompleksu I. Locus ten nazwano nuo od pierwszych liter: NADH:*ubiquinone oxidoreductase* a poszczególne podjednostki odpowiednio — NuoA, NuoB, itd. aż do NuoN [5]. Podjednostki NuoA, H, J, K, L, M, N są homologiczne z podjednostkami kodowanymi przez genom mitochondrialny ssaków, natomiast NuoB, C, D, E, F, G, I są homologiczne z podjednostkami kodowanymi przez genom jądrowy. W obrębie bakteryjnego kompleksu I (dehydrogenaza NADH 1) znajdują się wszystkie te podjednostki, w których określono występowanie miejsc wiążących NADH, FMN i centra Fe-S [5,6].

III. Kompleks I organizmów wyższych

Kompleks I izolowany z mitochondriów serca wołu ma ciężar cząsteczkowy około 907 kDa i zbudowany jest z co najmniej 43 różnych podjednostek [7, 8]. W obrębie kompleksu występuje grupa prostetyczna FMN, dwa centra dwunuklearne [2Fe-2S]: N1a i N1b, oraz cztery centra tetranuklearne [4Fe-4S] oznaczone jako N2, N3, N4, N5 [8].

Siedem podjednostek dehydrogenazy NADH o charakterze hydrofobowym jest kodowanych przez genom mitochondrialny [9]. Ich lokalizacja ogranicza się do części błonowej kompleksu. W obrębie tych podjednostek występują liczne helisy transbłonowe, które zakotwiczają kompleks w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. U zwierząt i grzybów podjednostki, których geny są zlokalizowane w genomie mitochondrialnym są nazywane ND (ND1-ND6 i ND4L) [4, 9]. U roślin natomiast podjednostki te nazwano NAD (NAD1-NAD6 i NAD4L) [10]. W genomie mitochondrialnym roślin znajdują się dodatkowo geny dwóch podjednostek, które u zwierząt i u grzybów są zlokalizowane w genomie jądrowym. Są to podjednostki o wielkości 49kDa i 30kDa. Nazwano je odpowiednio NAD7 i NAD9 [11-13]. U *Marchantia polymorpha* gen *nad7* jest jednak zlokalizowany w jądrze. W obrębie genomu mitochondrialnego pozostała kopia tego genu w postaci pseudogenu [14, 15].

Pozostałe 36 podjednostek dehydrogenazy NADH ssaków jest kodowanych przez genom jądrowy. Biosynteza tych podjednostek odbywa się w cytoplazmie, gdzie powstają jako prekursory zaopatrzone w sekwencję sygnalną umieszczoną na N-końcu białka. Sekwencja sygnalna umożliwia dotarcie prekursorów białkowych do mitochondriów i zanim białko przyjmie ostateczną dojrzałą formę, sekwencja ta musi zostać usunięta. Odcięcie presekwencji odbywa się w trakcie lub tuż po transporcie przez błony, przy udziale peptydazy MPP (*mitochondrial processing peptidase*) [16]. Białka kodowane przez genom jądrowy mają charakter hydrofilowy, nie posiadają transbłonowych helis i nie są związane z

błoną mitochondrialną. Wśród tych podjednostek są także te, które zawierają grupy odpowiedzialne za przebieg procesów oksydoredukcyjnych.

Podjednostki kompleksu I z mitochondriów serca wołu o masach cząsteczkowych 75kDa, 51kDa i 24kDa zawierają następujące grupy związane z procesami oksydoredukcyjnymi: podjednostka o masie 75kDa – 4Fe-S, 2Fe-2S, podjednostka o masie 51kDa — 4Fe-4S, FMN a podjednostka 24kDa — 2Fe-2S. Podjednostka 51kDa posiada dodatkowo miejsce wiązania NADH [3].

Z innych podjednostek kompleksu I na uwagę zasługują podjednostki oznaczone jako TYKY, PSST i PGIV, w których zidentyfikowano motywy cysteinowe, mogące tworzyć ligand z centrum Fe-S. Przynależność poszczególnych centrów Fe-S do określonych polipeptydów nie została dokładnie wyjaśniona. Jak wynika z tabeli 2 rozmieszczenie grup prostetycznych w ramach poszczególnych podjednostek sugerowane przez Albracht i wsp. oraz Ohnishi [6, 8] jest wyraźnie różne.

Białka żelazowo-siarkowe wykazują charakterystyczne widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) co umożliwia identyfikację centrów Fe-S. Sądzi się, że kompleks I może zawierać co najmniej osiem centrów Fe-S [6, 8]. Z tej ilości dokładnie scharakteryzowano centra N1a, N1b, N2, N3 i N4. Na podstawie wartości potencjału (E_m) określono najbardziej prawdopodobną drogę przepływu elektronów: NADH → FMN → N1 → N4 → N3 → N2 → UQ. Określono również stechiometrię translokacji protonów dla kompleksu I, która wynosi $4H^+/2e^-$ [17].

Wśród pozostałych podjednostek kompleksu I *Bos taurus* kodowanych przez genom jądrowy są białka, których grupa α aminowa jest modyfikowana potranslacyjnie. Do nich należy co najmniej 10 podjednostek tj: B_8 (8 kDa), B_9 (9 kDa), B_{12} (12 kDa), B_{13} (13 kDa), B_{14} (14 kDa), B_{15} (15 kDa), B_{17} (17 kDa), B_{18} (18 kDa), B_{22} (22 kDa) i SDAP. I tak np. grupa końcowa α-N podjednostek B_8, B_{13}, B_{14}, B_{15}, B_{17}, B_{22} jest acetylowana a koniec α-N podjednostki B_{18} ma przyłączoną grupę mirystylową. Przypuszcza się, że grupa mirystylowa może pomagać zakotwiczać podjednostkę w błonie [3].

Potranslacyjne przyłączenie kwasu pantotenowego do podjednostki SDAP jest ciekawą modyfikacją, gdyż białko to wykazuje właściwości białka nośnikowego acyli (*acyl carrier protein*) [18].

Ze względu na bardzo dużą masę cząsteczkową, kompleks I mitochondriów serca wołu poddawano obróbce w celu uzyskania mniejszych fragmentów, które dalej szczegółowo analizowano.

Traktowanie izolowanego enzymu jonami chaotropowymi prowadzi do uzyskania trzech frakcji oznaczonych odpowiednio: FP, IP i HP.

Frakcja flawoproteinowa – FP (*flavoprotein*) zawiera podjednostki o masach: 51 kDa, 24 kDa i 10 kDa. W obrębie frakcji białek żelazowo-siarkowych – IP (*iron-protein*) występują podjednostki mające charakter hydrofilowy. Są to podjednostki o masach: 75 kDa, 49 kDa, 30 kDa, 18 kDa, 15 kDa, 13 kDa, TYKY i PSST. Trzecia frakcja zwana frakcją białek hydrofobowych – HP (*hydrophobic protein*) nie jest złożona wyłącznie z podjednostek o charakterze hydrofobowym, gdyż występują tu również białka o charakterze hydrofilowym [3].

Kompleks I z mitochondriów serca wołu można także rozszczepić przy użyciu detergentów na dwa subkompleksy, które nazwano odpowiednio Iα i Iβ. Według Finel i wsp. [19] subkompleks Iα zawiera 23 podjednostki, które w większości mają charakter hydrofilowy. W obrębie tego subkompleksu występują podjednostki frakcji IP i FP, oraz podjednostki takie jak: ND2, MLRQ, B9, MWFE i 49kDa mające charakter hydrofobowy [3].

Subkompleks Iβ dehydrogenazy NADH *B. taurus* jest słabiej poznany. Według Finel i wsp. [19] subkompleks ten zbudowany jest z 17 podjednostek i ma masę 266 kDa. Wiadomo również, że z pośród siedmiu podjednostek kodowanych przez genom mitochondrialny dwie a mianowicie ND4 i ND5 występują na pewno w subkompleksie Iβ. Cały subkompleks ma charakter hydrofobowy i stanowi 75% domeny błonowej, której masę cząsteczkową oszacowano na 370kDa [3, 20] (Ryc. 2).

Finel i wsp. oraz Fearnley i wsp. [21, 22] wyodrębnili również subkompleks złożony z 15 podjednostek o charakterze hydrofilowym ze wszystkimi miejscami oksydoredukcyjnymi jakie znajdują się w subkompleksie Iα. Subkompleks ten nazwano Iλ i stwierdzono, że stanowi on pewną część subkompleksu Iα.

Kompleks I *Neurospora crassa* jest złożony z dwóch subkompleksów. Subkompleks skierowany w stronę matriks, tzw. ramię peryferyjne, złożony jest z 13 podjednostek kodowanych przez genom jądrowy, wśród których są podjednostki o masach 30, 38 i 49 kDa. Subkompleks osadzony w błonie mitochondrialnej, tzw. ramię hydrofobowe, zbudowany jest z podjednostek kodowanych przez genom mitochondrialny i z pozostałych podjednostek kodowanych przez genom jądrowy [23]. Wśród grzybów istnieją mutanty, u których brak niektórych podjednostek kompleksu I. Mutant u którego brak kodowanej jądrowo podjednostki 49kDa (odpowiednik NAD7 u

roślin) wykazuje zaburzenia w składaniu części peryferyjnej kompleksu. Natomiast brak podjednostki 21kDa kodowanej przez genom jądrowy prowadzi do zaburzeń w procesie składania części hydrofobowej kompleksu. Tego typu defekty prowadzą nie tylko do zaburzeń w procesie składania kompleksu, ale również powodują obniżenie aktywności enzymatycznej [24].

IV. Przestrzenny model kompleksu I

Strukturę przestrzenną dehydrogenazy NADH badano przy wykorzystaniu mikroskopu elektronowego jedynie w przypadku *Neurospora crassa* i *Bos taurus* [20, 25-27].

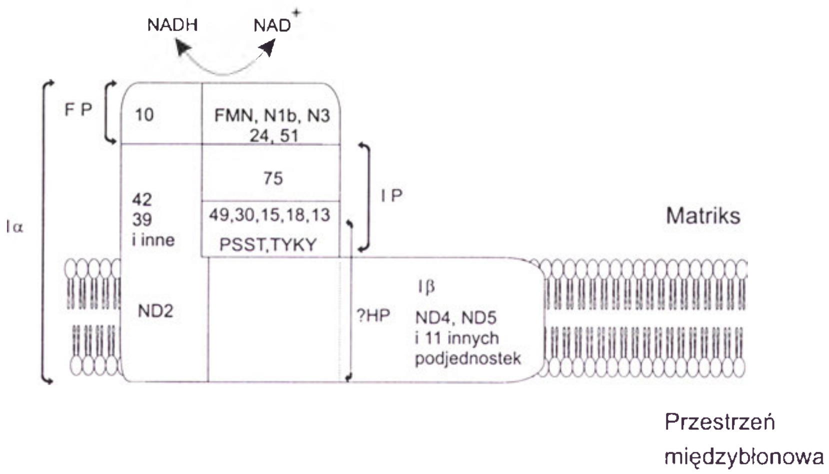
Model przestrzenny kompleksu I *N. crassa* ma kształt litery L. Ramię hydrofobowe jest umieszczone w błonie i tworzy domenę błonową, natomiast ramię hydrofilowe odgina się w stronę matriks mitochondrium i stanowi domenę peryferyjną. Ponieważ podjednostki kompleksu I *N. crassa* wykazują wyraźną homologię z podjednostkami dehydrogenazy NADH innych organizmów, zakłada się, że struktura tego kompleksu jest taka sama u innych organizmów.

się, że subkompleks Iβ stanowi domenę błonową, natomiast subkompleks Iα obejmuje domenę peryferyjną zwróconą w stronę matriks, część łączącą domenę peryferyjną i błonową oraz małą część domeny błonowej [20].

V. Kompleks I roślin

Analiza wyników dotycząca aktywności i transportu elektronów w obrębie roślinnego kompleksu I była częściowo ułatwiona dzięki porównaniom z kompleksem I *Bos taurus* i *Neurospora crassa*.

Mitochondrialny kompleks I izolowano dotychczas z *Vicia faba* [28], *Beta vulgaris* [29] i *Solanum tuberosum* [30] oraz z *Triticum aestivum* [31]. U *Beta vulgaris* wielkość kompleksu I oszacowano na około 700 kDa. Wynik ten uzyskano na podstawie filtracji żelowej i analizy w natywnym żelu poliakrylamidowym PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*). Kompleks I *Beta vulgaris* rozdzielono w denaturującym żelu SDS-PAGE i stwierdzono występowanie około 30 podjednostek. Kilka podjednostek zidentyfikowano w wyniku reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko odpowiednim polipepty-



Ryc. 2. Model kompleksu I *Bos taurus*. Rozmieszczenie najważniejszych podjednostek na podstawie składu subkompleksów Iα i Iβ oraz frakcji IP, FP i HP. Wg W a l k e r [3] (zmieniono).

Przestrzenną strukturę dehydrogenazy NADH badano również dla kompleksu I izolowanego z mitochondriów serca wołu [20]. Model tego wielopodjednostkowego enzymu ma również kształt litery L. Kompleks enzymatyczny ssaka ma wyraźnie przewężony rejon łączący domenę błonową z domeną peryferyjną. Domena zwrócona w stronę matriks jest większa u ssaka niż u *N. crassa*. Prawdopodobnie wynika to z wielkości całego kompleksu. U *Bos taurus* kompleks I zbudowany jest z co najmniej 43 podjednostek a u *Neurospora crassa* z co najmniej 36 podjednostek [3, 4, 7].

Wielkość kompleksu I *B. taurus* oszacowano na około 890 kDa, z czego 370 kDa przypada na domenę błonową a 520 kDa na domenę peryferyjną. Sądzi

dom dehydrogenazy NADH *N. crassa* [29]. U *Vicia faba* i *Solanum tuberosum* podjednostki identyfikowano też za pomocą poznania sekwencji N-końca polipeptydów [28, 30]. Zsumowanie mas cząsteczkowych 32 rozdzielonych podjednostek kompleksu I *S. tuberosum* dawało wartość 891 kDa, podczas gdy analiza w natywnym niebieskim żelu (*blue native gel*) białek błon mitochondrialnych *S. tuberosum* wykazała, że kompleks I ma wielkość około 1000 kDa [30, 32]. W kompleksie I *Triticum aestivum* występuje co najmniej 30 podjednostek, z czego dwanaście zidentyfikowano w wyniku reakcji z przeciwciałami [31].

L i n T s e - I i wsp. [33] badając widma EPR kompleksu I *S. tuberosum* potwierdzili w nim obec-

ność centrów N1b, N2, N3 i N4. Wartości potencjałów dla tych grup oksydoredukcyjnych zgadzają się z obecnie przyjętym modelem transportu elektronów w obrębie kompleksu I [34]. Wśród podjednostek dehydrogenazy NADH kodowanych przez genom jądrowy roślin najbardziej intensywnie badano geny białek o masach 76 kDa, 55 kDa, 28.5 kDa, 22 kDa [35-38]. Wynikało to częściowo z faktu, że geny tych podjednostek wykazują wyraźną homologię z odpowiednimi genami podjednostek kompleksu I innych organizmów, oraz że podjednostki te zawierają charakterystyczne motywy. Grohmann i wsp. [36] potwierdzili obecność miejsca wiązania NADH i FMN oraz centrum N3 w podjednostce 55 kDa ziemniaka. Okazało się również, że konserwatywne motywy cysteinowe występujące w sekwencji podjednostek 75 kDa, TYKY i PSST kompleksu I *B. taurus*, występują także odpowiednio w podjednostkach 76 kDa, 28.5 kDa i 22 kDa *S. tuberosum* [35, 37, 38]. Wykorzystując bazę danych EST u *Arabidopsis thaliana* odkryto jeszcze jedną podjednostkę o masie 24 kDa [10].

Jądrowe geny podjednostek kompleksu I charakteryzują się obecnością małych spliceosomalnych intronów zawierających dużą ilość par A+T. Stwierdzono np. że geny podjednostki 22 kDa-PSST *A. thaliana* i 55 kDa *A. thaliana* oraz *S. tuberosum* są przerwane jednym intronem [36, 38]. Ciekawe, że w genie białka o masie 55 kDa intron jest zlokalizowany zaraz za pierwszym kodonem (ATG). Schmidt-Bleek i wsp. [37] stwierdzili, że gen białka żelazowo-siarkowego o masie 28.5 kDa *A. thaliana* i *S. tuberosum* jest przerwany nawet siedmioma intronami a wielkość intronów waha się od 60 do 1700 nukleotydów.

Badano również ekspresję genów podjednostek kompleksu I kodowanych przez genom jądrowy. Wiadomo już, że ekspresja genów podjednostek łańcucha oddechowego kodowanych przez jądro jest 6-10 krotnie wyższa w organach kwiatowych niż w liściach i korzeniach a regulacja tych procesów jest tkankowo-specyficzna [36]. Ciekawe, że podwyższoną ekspresję na poziomie RNA w organach kwiatowych zaobserwowano również dla takich białek jak białko Fe-S Rieske (podjednostka kompleksu III), czy też podjednostka $F_1\beta$ ATP-azy (podjednostka kompleksu V) [39, 40]. Analogiczne wyniki otrzymano analizując ekspresję podjednostek 76 kDa, 55 kDa *A. thaliana* i *S. tuberosum* oraz 28.5 kDa-TYKY *S. tuberosum* i 22 kDa-PSST *A. thaliana* oraz *S. tuberosum* [35-38]. U *A. thaliana* badania ekspresji przeprowadzono analizując różne części kwiatu. Okazało się, że wysoka ekspresja na poziomie RNA dotyczyła pylnika i pyłku kwiatowego [41].

Geny kompleksu I roślin zlokalizowane w genomie mitochondrialnym dotyczą genów oznaczonych jako *nad1* – *nad6*, *nad4L* oraz dodatkowo *nad7* i *nad9*. Te dodatkowe geny kodują polipeptydy homologiczne z białkami o masie 49 kDa i 30 kDa ssaków, o których wiadomo, że ich geny są kodowane przez genom jądrowy.

Ponieważ budowa genów podjednostek kodowanych przez genom mitochondrialny jest przedmiotem równolegle prezentowanej pracy, w niniejszym opracowaniu będą one pominięte.

W sumie u roślin zidentyfikowano dotychczas 14 podjednostek kompleksu I. Jest to ilość, która tworzy tzw. „minimalny" kompleks u zwierząt i bakterii. Należy podkreślić, że w genomie chloroplastowym znaleziono 11 genów homologicznych z tymi czternastoma podstawowymi podjednostkami kompleksu I [42]. Te chloroplastowe geny kodują podjednostki, które wchodzą w skład kompleksu enzymatycznego — NAD(P)H:plastochinon oksydoreduktaza (Tab. 1). Sugeruje się, że funkcją chloroplastowego kompleksu jest transport elektronów sprzężony z translokacją protonów [43]. Ze względu na wyraźną homologię między podjednostkami chloroplastowego i mitochondrialnego kompleksu przypuszcza się, że NAD(P)H:plastochinon oksydoreduktaza ma podobną budowę do mitochondrialnej dehydrogenazy NADH.

VI. Podjednostka PSST – potencjalne miejsce wiązania centrum N2

Po raz pierwszy podjednostka PSST została scharakteryzowana u gatunku *Bos taurus* [44, 45]. Nazwa PSST powstała od pierwszych czterech aminokwasów dojrzałego białka. Obecnie znane są sekwencje cDNA genu PSST takich gatunków jak *Bos taurus* [45], *Arabidopsis thaliana* [38], *Solanum tuberosum* [38], *Brassica oleracea* [46] oraz *Lupinus luteus* [47]. Znana jest także sekwencja cDNA ludzkiego genu PSST [48]. W internetowej bazie danych EST znajdują się sekwencje homologiczne z cDNA genu PSST z takich gatunków jak *Lycopersicon esculentum* – pomidor (AI489436), *Gossypium hirsutum*.- bawełna (AI731321), *Zea mays* – kukurydza (AI964559), *Avena sativa* – owies (AI978363). Ciekawe, że gen PSST odkryto również w genomie mitochondrialnym np. u *Paramecium tetraurelia* [49, 50], a także u bakterii np. u *Paracoccus denitrificans* [51]. Ciężar cząsteczkowy podjednostki PSST został oszacowany na około 22kDa. Homologiem chloro-

plastowym PSST jest podjednostka NDH-K. Gen *ndh-K* znajduje się w obrębie genomu chloroplastowego i koduje białko wchodzące w skład kompleksu NAD(P)H:plastochinon oksydoreduktaza. Gen *ndh-K* (wcześniej określany jako *psb G*) poznano u kilku gatunków roślinnych: *Glycine max* [52], *Nicotiana tabacum* [53], *Oryza sativa* [54], *Zea mays* [55], *Triticum aestivum* [56], *Lupinus luteus* [57], *Pisum sativum* [58] a także u wątrobowców *Marchantia polymorpha* [59].

Białko PSST kodowane przez genom jądrowy powstaje jako prekursor. Presekwencja podjednostki umożliwia dotarcie prekursora do błony mitochondrialnej i jego translokację. Usunięcie sekwencji sygnalnej umożliwia uformowanie dojrzałego białka PSST.

Badania ekspresji na poziomie RNA podjednostki PSST przeprowadzono u *A. thaliana* [38], *S. tuberosum* [38] i *B. oleracea* [46] oraz u człowieka [48]. Stwierdzono, że u roślin najwyższa ekspresja występuje w organach kwiatowych, natomiast najmniejsza w korzeniu. Jak wykazano u *A. thaliana* wysoka ekspresja w kwiatach dotyczy szczególnie pylnika i pyłku kwiatowego [41]. U człowieka bardzo wysoki poziom ekspresji występuje przede wszystkim w takich organach jak serce i wątroba. Poziom ekspresji tej podjednostki niewątpliwie wiąże się z dużą aktywnością kompleksu I, a więc i łańcucha oddechowego w organach, w których potrzeba dużo energii i tlenu.

PSST w obrębie sekwencji białkowej zawiera motyw L/TxCCx$_{61}$GxCxxxGx$_{24-25}$GCPP. Jest on podobny do konserwatywnej sekwencji CxxCx$_n$Gx-CxxxGx$_m$GCPP (gdzie n = 61-106, m = 24-61) obecnej w rejonie N-końca małych podjednostek hydrogenaz NiFe [60, 61]. Struktura krystaliczna hydrogenazy NiFe z *D. gigas* [62] ujawniła zaangażowanie reszty Cys w stabilizacji ligandu — centrum Fe-S. Ponieważ motyw występujący w PSST i innych homologicznych podjednostkach ma jako pierwszy aminokwas Leu lub Thr, obecność centrum Fe-S może mieć miejsce. Badania EPR nie wykazały jednoznacznie, że PSST jest białkiem żelazowo-siarkowym; istnieje jednak wiele danych, które wskazywałyby na obecność takiego centrum. Na przykład Schuler i wsp. [63], wykorzystując inhibitor [^{3}H]TDP w badaniach prowadzonych z izolowanym kompleksem I bakterii *Paracoccus denitrificans* i *Thermus thermophilus*, wykazali udział podjednostki PSST w procesie transportu elektronu na drodze pomiędzy N2 a pulą ubichinonu. Stosując znakowany radioaktywnie inhibitor [^{3}H]TDP w niskim stężeniu, Schuler i wsp. uzyskali zablokowanie transportu elektronów w obrębie kompleksu I. Gdy podjednostki kompleksu I rozdzielono elektroforetycznie w warunkach SDS/PAGE i zmierzono pojedynczy sygnał uzyskany dla białka okazało się, że ma ono wielkość około 23kDa. W wyniku sekwencjonowania fragmentu podjednostki 23kDa, białko to zostało zidentyfikowane jako PSST.

Centrum Fe-S N2, jedyne ze znanych centrów nie jest wyraźnie przypisane do określonej podjednostki. Jako potencjalne miejsca wskazuje się na podjednostki TYKY i PSST. N2 uznano za jeden z istotniejszych centrów Fe-S w kompleksie I. Wartość Em dla tego centrum jest najwyższa. Próby wykazania, w obrębie której domeny kompleksu I jest zlokalizowane centrum N2, nie doprowadziły do jednoznacznego

Tabela 2.

Rozmieszczenie grup FMN i centrów Fe-S, oraz liczba podjednostek kodowanych przez jądro w „minimalnym" kompleksie I *Bos taurus*. Wg Ohnishi [6] (zmieniono).

Podjednostki Kompleksu I	Model wg Albracht [8]		Model wg Ohnishi [6]	
	Grupy prostetyczne	Liczba podj.	Grupy prostetyczne	Liczba podj.
75kDa	1(N1a), 2 (N4)	1	1(N1b), 1(N4), 1(N5)	1
51kDa	2 (FMN), 2 (N3)	2	1(FMN), 1(N3)	1
24kDa	1(N1b)	1	1(N1a)	1
49kDa	brak	1	brak	1
30kDa	brak	1	brak	1
TYKY	2 (N2)	1	2 [4Fe-4S]	1
PSST	brak lub 1[4Fe-4S]	1	1(N2)	1
Całkowita liczba grup prostetycznych	2FMN i 8 lub 9 centrów Fe-S		1FMN i 8 centrów Fe-S	

wyniku. Przyjęto, że N2 nie jest zlokalizowane w podjednostce błonowej, ale jest związane z białkiem leżącym na granicy domeny błonowej i peryferyjnej [19, 64, 65]. Jak wynika z badań wykonanych na subfrakcjach kompleksu I *E. coli*, centrum N2 zlokalizowane jest w części sąsiadującej z regionem amfipatycznym [6]. Do tej subfrakcji należą podjednostki NuoB [PSST], NuoCD i NuoI [TYKY]. Ze względu na obecność motywu cysteinowego w budowie wzięto pod uwagę dwie podjednostki: NuoB i NuoI. Analizując motyw cysteinowy występujący w NuoB [$C_{63}C_{64}xxE_{67}$-C_{129}-$C_{158}P$] brano pod uwagę możliwość tworzenia przez podjednostkę NuoB „mix-ligandu", poprzez który centrum N2 byłoby związane z podjednostką. Chociaż motyw zawiera cztery konserwatywne cysteiny, dwie: C_{63},C_{64} sąsiadują z sobą, a więc tylko jedna z nich bierze udział w stabilizacji ligandu i w związku z tym tylko trzy reszty cysteinowe, dosyć znacznie oddalone od siebie, mogą tworzyć właściwe wiązanie. Ponieważ reszta Cys_{158} sąsiaduje z resztą Pro_{159}, sugeruje się, że ewentualne centrum Fe-S jest tetranuklearne [4Fe-4S] [66]. Znanych jest kilka centrów [4Fe-4S] związanych z podjednostką poprzez system „mix-ligandów". „Mix-ligandy" są tworzone przez reszty Cys i inne aminokwasy np. Asp. U *Paracoccus furiosus* centrum [4Fe-4S] jest związane z białkiem poprzez trzy reszty Cys (C) i jedną resztę Asp (D) [motyw: CxDxxCC]. Takie centrum można identyfikować za pomocą EPR w temp. poniżej 15K [67]. Ponieważ w motywie cysteinowym podjednostki PSST istnieje konserwatywna reszta Glu (E) w pozycji 67 [$C_{63}C_{64}xxE_{67}$-C_{129}-$C_{158}P$] przypuszcza się, że również PSST może tworzyć centrum Fe-S w postaci ligandu. Pomiar EPR w temp. poniżej 10K dawał słaby sygnał, który wskazywałby na obecność centrum [4Fe-4S] [66]. Wynik ten nie jest jednak wystarczająco przekonywujący by uznać, że w podjednostce PSST na pewno występuje centrum N2.

Ostatnio poznano sekwencje cDNA genu wyizolowanego z biblioteki *N. crassa*, którego sekwencja jest homologiczna z PSST [68]. Podjednostkę tą nazwano NUO-19,3 i nie jest ona izolowana ani z domeną błonową ani z peryferyjną. Obecność tej podjednostki jest monitorowana jedynie wtedy, gdy obie domeny są połączone. NUO-19,3 można wyekstrahować z błony mitochondrialnej przy wysokim pH, co znaczy, że nie jest to podjednostka błonowa. Wang i wsp. [69] uważają, że niestabilność homologicznego z PSST białka NUO-19,3 przy rozdzielaniu dwóch domen kompleksu I, mogła by tłumaczyć brak również centrum N2 w izolowanej domenie peryferyjnej kompleksu I *N. crassa*. Natomiast obecność podjednostki homologicznej do TYKY w części peryferyjnej kompleksu I, wykazana przez Sousa i wsp. [68], przemawia za tym, że to podjednostka PSST a nie TYKY wiąże centrum N2.

VII. Podsumowanie

Intensywne badania kompleksu I różnych organizmów, w istotny sposób przyczyniły się do wyjaśnienia mechanizmu sprzężenia transportu elektronów z translokacją protonów w poprzek błony. Nie do końca jest jasny sens obecności tak wielu podjednostek w kompleksie I wyższych organizmów, skoro tylko część z nich jest niezbędna do utworzenia „minimalnego" aktywnego kompleksu enzymatycznego. Dehydrogenaza NADH organizmów wyższych jest złożona z co najmniej 43 podjednostek to jest z około trzy razy większej ilości niż u bakterii. Możliwe, że występowanie większej liczby podjednostek w tym kompleksie wiąże się również z dodatkowymi funkcjami, których nie znamy. Być może część dodatkowych podjednostek jest zaangażowana w proces poprawnego składania w kompleks podjednostek pochodzenia jądrowego i mitochondrialnego. Możliwe również, że część podjednostek jest niezbędna do utrzymania właściwej struktury przestrzennej kompleksu i do właściwego umiejscowienia w błonie wewnętrznej.

Badania dotyczące mitochondrialnego kompleksu I mają również znaczenie użytkowe, gdyż pojawienie się defektów w kompleksie I wiąże się między innymi z rozwojem chorób mitochondrialnych [70, 71].

Podziękowania

Autorka niniejszej pracy składa serdeczne podziękowania Pani Profesor dr hab. Halinie Augustyniak za cenne uwagi i pomoc przy pisaniu tego artykułu. Praca została zrealizowana w ramach grantu KBN nr 6P04B0181B.

Artykuł otrzymano 13 grudnia 1999 r.
Zaakceptowano do druku 28 lutego 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Møller I M, Rasmusson A G, Fredlund K M (1993) *J Bioenerg Biomembr* **25**: 377-384.
2. Soole K L, Menz R I (1995) *J Bioenerg Biomembr* **27**: 397-406
3. Walker J E (1992) *Quart Rev Biophys* **25**: 253-324
4. Videira A (1998) *Biochim Biophys Acta* **1364**: 89-100
5. Weidner U, Geier S, Ptock A, Friedrich T, Leif H, Weiss H (1993) *J Mol Biol* **233**: 109-122

6. Ohnishi T (1998) *Biochim Biophys Acta* **1364**: 186-206.
7. Buchanan S K, Walker J E (1996) *Biochem J* **318**: 343-349
8. Albracht S P J, Mariette A, Ph de Jong (1997) *Biochim Biophys Acta* **1318**: 92-106
9. Fearnley I M, Walker J E (1992) *Biochim Biophys Acta* **1140**: 105-134
10. Rasmusson A G, Heiser V, Zabaleta E, Brennicke A, Grohmann L (1998) *Biochim Biophys Acta* **1364**: 101-111
11. Gäbler L, Herz U, Liddell A, Leaver C J, Schröder W, Brennicke A, Grohmann L (1994) *Mol Gen Genet* **244**: 33-40
12. Grohmann L, Thieck O, Herz U, Schröder W, Brennicke A (1994) *Nucl Acids Res* **22**: 3304-3311.
13. Unseld M, Marienfeld J, Brandt P, Brennicke A (1997) *Nat Genet* **15**: 57-61
14. Kobayashi Y, Knoop V, Fukuzawa H, Brennicke A, Ohyama K (1997) *Mol Gen Genet* **256**: 589-592
15. Oda K, Yamato K, Ohta E, Nakamura Y, Takemura M, Nozato N, Akashi K, Kanegae T, Ogura Y, Kohchi T, Ohyama K (1992) *J Mol Biol* **223**: 1-7
16. Glaser E, Sjöling S, Tanudji M, Whelan J (1998) *Plant Mol Biol* **38**: 311-338
17. Weiss H, Friedrich T (1991) *J Bioenerg Biomembr* **23**: 743-771
18. Runswick M J, Fearnley I M, Skehel J M, Walker J E (1991) *FEBS Lett* **286**:121-124
19. Finel M, Skehel J M, Albracht S P J, Fearnley I M, Walker J E (1992) *Biochemistry* **31**: 11425-11434
20. Grigorieff N (1998) *J Mol Biol* **277**: 1033-1046
21. Finel M, Majander A S, Tyynela J, Dejong A M P, Albracht S P J, Wikstrom M (1994) *Eur J Biochem* **226**: 237-242
22. Fearnley I M, Skehel J M, Walker J E (1994) *Biochem Soc Trans* **22**: 551-555
23. Friedrich T, Hofhaus G, Ise W, Nehls U, Schmitz B, Weiss H (1989) *Eur J Biochem* **180**: 173-180
24. Gutierres S, Combettes B, De Paepe R, Mirande M, Lelandais C, Vedel F, Chétrit P (1999) *Eur J Biochem* **261**: 361-370
25. Leonard K, Haiker H, Weiss H (1987) *J Mol Biol* **194**: 277-286
26. Hofhaus G, Weiss H, Leonard K (1991) *J Mol Biol* **221**: 1027-1043
27. Guénebaut V, Vincentelli R, Mills D, Weiss H, Leonard K R (1997) *J Mol Biol* **265**: 409-418
28. Leterme S, Boutry M (1993) *Plant Physiol* **102**: 435-443
29. Rasmusson A G, Mendel-Hartvig J, Møller I M, Wiskich J T (1994) *Physiol Plant* **90**: 607-615
30. Herz U, Schröder W, Liddell A, Leaver C J, Brennicke A, Grohmann L (1994) *J Biol Chem* **269**: 2263-2269
31. Combettes B, Grienenberger J M (1999) *Biochimie* **81**: 645-653
32. Jänsch L, Kruft V, Schmitz U K, Braun H-P (1996) *Plant J* **9**: 357-368
33. Lin Tse-I, Sled V D, Ohnishi T, Brennicke A, Grohmann L (1995) *Eur J Biochem* **230**: 1032-1036
34. Brandt U (1997) *Biochim Biophys Acta* **1318**: 79-91
35. Rasmusson A G, Heiser V, Irrgang K D, Brennicke A, Grohmann L (1998) *Plant Cell Physiol* **39**: 373-381
36. Grohmann L, Rasmusson A G, Heiser V, Thieck O, Brennicke A (1996) *Plant J* **10**: 793-803
37. Schmidt-Bleek K, Heiser V, Thieck O, Brennicke A, Grohmann L (1997) *Mol Gen Genet* **253**: 448-454
38. Heiser V, Brennicke A, Grohmann L (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 1195-1204
39. Huang J, Struck F, Matzinger D F, Levings III C S (1994) *Plant Cell* **6**: 439-448
40. Smart C J, Monéger F, Leaver C J (1994) *Plant Cell* **6**: 811-825
41. Zabaleta E, Heiser V, Grohmann L, Brennicke A (1998) *Plant J* **15**: 49-59
42. Sugiura M (1992) *Plant Mol Biol* **19**: 149-168
43. Scherer S (1990) *TIBS* **15**:458-462
44. Masiu R, Wakabayashi S, Matsubara H, Hatefi Y (1991) *J Biochem* **110**: 575-582
45. Arizmendi J M, Runswick M J, Skehel J M, Walker J E (1992) *FEBS Lett* **301**: 237-242
46. Pogson B J, Downs C G, Davies K M, Morris S C, Buchanan-Wollaston V (1995) *Plant Physiol* **108**: 859-860
47. Piękna D, Sikorski M, Augustyniak H (1999) *Streszczenia XXXV Zjazd PTBioch*, Olsztyn
48. Hyslop S J, Duncan A M V, Pitkänen S, Robinson B H (1996) *Genomics* **37**: 375-380
49. Pritchard A E, Venuti S E, Ghalambor M A, Sable C L, Cummings D J (1989) *Gene* **78**: 121-134
50. Pritchard A E, Seilhamer J J, Mahalingam R, Sable C L, Venuti S E, Cummings D J (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 173-180
51. Xu X, Matsuno-Yagi A, Yagi T (1992) *Biochemistry* **31**: 6925-6932
52. Whelan J, Young S, Day D A (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 887-895
53. Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng B Y, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986) *EMBO J* **5**: 2043-2049
54. Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun C R, Meng B Y, Li Y Q, Kanno A, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K, Sugiura M (1989) *Mol Gen Genet* **217**: 185-194
55. Steinmüller K, Ley A C, Steinmetz A A, Sayre R T, Bogorad L (1989) *Mol Gen Genet* **216**: 60-69
56. Nixon P J, Gounaris K, Coomber S A, Hunter C N, Dyer T A, Barber J (1989) *J Biol Chem* **264**: 14129-14135
57. Oczkowski M, Paszkiewicz J, Piatyszek M, Augustyniak H (1997) *Plant Sci* **127**: 171-177
58. Elortza F, Asturias J A, Arizmendi J M (1999) *Plant Cell Physiol* **40**: 149-154
59. Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H, Ozeki H (1986) *Nature* **322**: 571-574
60. Albracht S P J (1993) *Biochim Biophys Acta* **1144**: 221-224
61. Albracht S P J (1994) *Biochim Biophys Acta* **1188**: 167-207
62. Volbeda A, Charon M-H, Piras C, Hatchikian E C, Frey M, Fontecilla-Camps J C (1995) *Nature* **373**: 580-587
63. Schuler F, Yano T, Di Bernardo S, Yagi T, Yankovskaya V, Singer T P, Casida J E (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4149-4153
64. Fecke W, Sled V D, Ohnishi T, Weiss H (1994) *Eur J Biochem* **220**: 551-558
65. Yagi T, Yano T, Di Bernardo S, Matsuno-Yagi A (1998) *Biochim Biophys Acta* **1364**: 125-133
66. Ohnishi T, Sled V D, Yano T, Yagi T, Burbaev D S, Vinogradov A D (1998) *Biochim Biophys Acta* **1365**: 301-308
67. Park J B, Fan C L, Hoffman B M, Adams M W (1991) *J Biol Chem* **266**: 19351-19356
68. Sousa R, Barquera B, Duarte M, Finel M, Videira A (1999) *Biochim Biophys Acta* **1411**: 142-146
69. Wang D C, Meinhardt S W, Sackmann U, Weiss H, Ohnishi T (1991) *Eur J Biochem* **197**: 257-264
70. Wallace D C (1989) *Trends Genet* **5**; 9-13
71. Bentlage H A C M, Janssen A J M, Chomyn A, Attardi G, Walker J E, Schägger H, Sengers R C A, Trijbels F J M (1995) *Biochim Biophys Acta* **1234**: 63-73

Mitochondrialne geny podjednostek dehydrogenazy NADH kompleksu I łańcucha oddechowego. Redagowanie ich transkryptów

Mitochondrial genes of complex I NADH dehydrogenase of the respiratory chain subunits. The editing of their transcripts

MICHAŁ RUREK*

Spis treści:

Contents:

Wykaz stosowanych skrótów: *atp* — geny podjednostek syntazy ATP (ATPazy); *ccb*206 — gen podjednostki transportera hemu; CMS — cecha cytoplazmatycznej męskiej sterylności; *cob* — gen białka apocytochromu b; *cox* — mitochondrialne geny podjednostek oksydazy cytochromowej; ct DNA — chloroplastowy DNA; gRNA — *guide* RNA; FMN — mononukleotyd flawinowy; mat-r — sekwencja kodująca białko podobne do maturazy; mt DNA — mitochondrialny DNA; *nad* — mitochondrialne geny podjednostek NAD kompleksu I roślin; nd — mitochondrialne geny podjednostek ND kompleksu I zwierząt i grzybów; *ndh* — chloroplastowe geny podjednostek dehydrogenazy NAD(P)H; *rpl* — geny białek dużej podjednostki mitorybosomów; *rps* — geny białek małej podjednostki mitorybosomów; PSST — jądrowa podjednostka kompleksu I zawierająca motyw: Pro-Ser-Ser-Thr; TR/c-erbA — receptor kodowany przez protoonkogen c-erbA wiążący hormony tarczycy; TYKY — jądrowa podjednostka kompleksu I zawierająca motyw: Thr-Tyr-Lys-Tyr.

*Mgr, Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

I. Wstęp

Kompleks I, fosforylująca dehydrogenaza NADH (oksydoreduktaza NADH — ubichinon, E.C. 1.6.99.3) jest wyjątkowo złożonym i najmniej poznanym enzymem wśród białek wchodzących w skład mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Znana jest natomiast podstawowa funkcja kompleksu I. Przenosi on elektrony z NADH na ubichinon poprzez szereg centrów redoks obejmujących grupę prostetyczną FMN i centra żelazowo — siarkowe, oraz pompuje protony z matriks, tworząc siłę protonomotoryczną niezbędną do syntezy ATP [1]. Kompleks I wyizolowano dotychczas m.in. z mitochondriów wołu (*Bos taurus*) [2], grzyba *Neurospora crassa* [2], a spośród roślin wyższych — z buraka (*Beta vulgaris*) [3], wyki (*Vicia faba*) [4], ziemniaka (*Solanum tuberosum*) [5] i pszenicy (*Triticum aestivum*) [6]. Stwierdzono, że enzym ten wykazuje pewne cechy wspólne dla wszystkich organizmów żywych. Należy do nich głównie obecność centrów redoks oraz podjednostek wiążących NADH i ubi-

chinon [7]. W skład dehydrogenazy NADH zwierząt, grzybów i roślin wchodzi od 30 do 43 podjednostek białkowych [8], podczas gdy u bakterii minimalny kompleks I składa się z 14 podjednostek [2, 4, 5]. Kilka podjednostek jest kodowanych przez genom mitochondrialny, a pozostałe przez genom jądrowy. Całkowitą masę cząsteczkową kompleksu I różnych organizmów eukariotycznych oszacowano na około 700 do 1000 kDa. Dla porównania masę cząsteczkową minimalnego kompleksu I bakterii, który składa się z 14 podjednostek oszacowano na 525 kDa [9].

W niniejszym artykule zostaną scharakteryzowane geny podjednostek kompleksu I kodowane przez mitochondrialny DNA zwierząt, grzybów i roślin oraz ich ekspresja. Uczestniczą one w wielu rearanżacjach genomu mitochondrialnego, które w efekcie końcowym prowadzą czasami do mutacji letalnych albo objawów chorobowych organizmu. Szczególny nacisk zostanie położony na opis potranskrypcyjnych zmian sekwencji ich mRNA, czyli proces redagowania (ang. *editing*), który zachodzi ze szczególną intensywnością w mitochondriach. Na łamach „Postępów Biochemii", jak i w innych czasopismach polskojęzycznych ukazało się w ostatnim dziesięcioleciu kilka prac poświęconych procesowi redagowania [10-14]. Pojawienie się nowych danych, szczególnie dotyczących redagowania mitochondrialnych podjednostek kompleksu I skłania do ich przedstawienia w niniejszym artykule.

II. Geny podjednostek dehydrogenazy NADH

Fakt, że geny podjednostek dehydrogenazy NADH wrażliwej na rotenon (kompleks I), zwanej dalej dehydrogenazą NADH, są kodowane zarówno przez genom mitochondrialny, jak i jądrowy wynika jak się sądzi stąd, że w trakcie ewolucji większość genów kodujących podjednostki dehydrogenazy NADH uległa przeniesieniu z mitochondriów do jądra komórkowego i została zintegrowana z jądrowym DNA. Spowodowało to zmianę hydrofobowości poszczególnych podjednostek.

Ilość podjednostek dehydrogenazy NADH kodowanych przez genom mitochondrialny wykazuje pewne zróżnicowanie. U ssaków genom mitochondrialny koduje 7 podjednostek dehydrogenazy NADH, nazywanych odpowiednio: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6. Wszystkie one występują w części błonowej kompleksu I [2]. Taką samą ilość i usytuowanie stwierdzono w innych grupach zwierząt, jak: ptaki, płazy, ryby, owady, płazińce, obleńce, skorupiaki, mięczaki, jamochłony i pierwotniaki. Wśród pierwotniaków wyjątek stanowi *Plasmodium falciparum,* który nie zawiera w mt DNA żadnych genów podjednostek ND [15]. Z kolei genom mitochondrialny pantofelka (*Paramecium*) posiada oprócz wymienionych wyżej genów, dodatkowe geny kodujące trzy podjednostki, które u ssaków są kodowane przez genom jądrowy. Genom mitochondrialny pantofelka koduje też podjednostkę *ndh*K chloroplastowej dehydrogenazy NAD(P)H, co dowodzi współdziałania funkcyjnego tych dwóch enzymów [16]. Natomiast u *Crithidia fasciculata* i *Leishmania tarentolae* w tzw. dużych kółkach (ang. *maxicircles*) mt DNA występują zarówno geny podjednostek ND1, ND4 i ND5 jak i gen kodujący podjednostkę 49 kDa, która jest zwykle kodowana przez genom jądrowy [17]. Trypanosomy posiadają ponadto geny podjednostek ND8 i ND9, które u ssaków zawarte są w jądrowym DNA [18, 19]. W mt DNA innych pierwotniaków liczba podjednostek jest również zwiększona i u ameby obejmuje aż 10 genów podjednostek dehydrogenazy NADH [20].

Poznanie pełnej sekwencji genomu mitochondrialnego grzyba *Hansenula wingei* pozwoliło stwierdzić, że podobnie jak w mt DNA uprzednio zbadanych gatunków *Podospora anserina* i *Neurospora crassa* [15, 21-24] oraz ssaków występuje 7 genów nd. Genów nd nie znaleziono natomiast w genomie mitochondrialnym drożdży pączkujących *Saccharomyces.*

U roślin geny podjednostek dehydrogenazy NADH zlokalizowane w mt DNA przyjęto nazywać *nad*, a odpowiadające im podjednostki — NAD. Ilość zidentyfikowanych mitochondrialnych genów podjednostek dehydrogenazy NADH roślin wyższych wynosi 9. Taka ilość została również potwierdzona u rzodkiewnika pospolitego, jedynej rośliny nasiennej, u której poznano budowę mt DNA [15]. Należy podkreślić, że geny występujące u roślin oznaczone jako *nad*7 i *nad*9 u ssaków i grzybów są zlokalizowane w genomie jądrowym. U niektórych glonów, na przykład u brunatnicy *Chondrus crispus* stwierdzono jednak brak tych 2 genów. Zielenica *Chlamydomonas reinhardtii* nie zawiera natomiast genów *nad*3 i *nad*4L [15]. Z kolei, u porostnicy wielokształtnej (*Marchantia polymorpha*), której pełna sekwencja genomu mitochondrialnego jest także znana, okazało się, że gen *nad*7 jest zlokalizowany w jądrze komórkowym, natomiast w mt DNA pozostał pseudogen *nad*7 [25].

Jak wynika z przedstawionych danych, liczba podjednostek kodowanych przez genom mitochondrialny jest nieznaczna, a zatem większość podjednostek jest kodowana przez genom jądrowy.

III. Organizacja, budowa i ekspresja genów nd i *nad*

III-1. Geny nd zwierząt

Sześć genów kodujących podjednostki nd zwierząt tkankowych znajduje się na nici H mt DNA i jest transkrybowanych w postaci pojedyńczej, policistronowej cząsteczki mRNA. Gen nd6 występuje na nici L i wchodzi w skład drugiej policistronowej cząsteczki mRNA. Ilość, jak również liczba kopii genów nd zwierząt podlega pewnym fluktuacjom. Okazało się na przykład, że zarówno gen nd4, jak i nd4L ludzkich mitochondriów posiadają kopię w jądrze [26]. Zaobserwowano również, że w jednej z linii komórek nowotworowych człowieka nastąpiła delecja genów nd3 i nd4L w mt DNA [27], natomiast w linii komórkowej A9 myszy dehydrogenaza NADH nie posiada podjednostki NAD6, co spowodowało prawie całkowite zahamowanie aktywności tego enzymu [28].

Organizacja, budowa oraz obraz ekspresji genów nd wykazują zróżnicowanie w poszczególnych grupach zwierząt [29]. Na przykład u kręgowców geny nd3 i nd6 nie posiadają typowego kodonu „start". Z kolei gen nd3 posiada kodon „stop" jedynie u gryzoni i waleni [30-31], a w genie nd4 nie występuje kodon „stop" u żadnego z poznanych gatunków ssaków i jest on kreowany przez potranskrypcyjną poliadenylację [30-32]. U obleńców niektóre geny nd wykorzystują jako kodon „start" tryplet TTG a nietypowe kodony „stop" występują w genach nd1, nd2, nd3 i nd5 [33]. U owadów organizacja genów nd1, nd4, nd4L i nd6 jest podobna [34], ale czasami występują różnice w budowie; na przykład u *Boophilus microplus* [35] 3' końcowy rejon genu nd1 jest 5 razy powtórzony. Organizacja genów nd w przypadku chitonów znacznie odbiega od reszty mięczaków i obejmuje rozległe rearanżacje [36], natomiast organizacja genów nd ameby przypomina układ odpowiednich genów *nuo* eubakterii, gdyż geny ułożone są następująco: nd3-nd9-nd7, nd6-nd5, nd4-nd2; niektóre z tych genów zachodzą na siebie [20]. U innych pierwotniaków, jak trypanosomy geny nd1, nd4, nd5, nd7, nd8, nd9 są zawarte w tzw. „dużych kółkach" (ang. *maxicircles*) genomu mitochondrialnego [18]. Różnice w budowie genów nd dotyczą występowania insercji i delecji, co ma miejsce u skorupiaków w genach nd1, nd2, nd3 i nd5 [37], lub występowania intronu; intron zidentyfikowano na przykład w genie nd5 jamochłona *Metridium senile* [38]. Zakłada się, że podobnie jak w przypadku innych genów mitochondrialnych, występujące pomiędzy genami nd geny tRNA biorą udział w dojrzewaniu mRNA.

Na ekspresję genów nd zwierząt wpływa wiele czynników. Stwierdzono na przykład, że akumulacja mRNA podjednostki ND2 w zarodkach królika zależy od zmian natlenienia kultur blastocystów [39]. Z kolei w mózgu i sercu szczura ekspresja mRNA podjednostki ND3 jest regulowana przez hormony tarczycy, gdyż kodujący ją gen posiada sekwencję wiążącą się specyficznie z receptorem TR/c-erbA. Niedobór tych hormonów może zatem obniżać poziom transkryptu nd3 [40]. Kodama i wsp. [41] donieśli, że w starzejących się ludzkich fibroblastach linii MRC-5 następuje zwiększenie akumulacji mRNA nd4 i nd4L. Sugerują oni, że ekspresja podjednostek ND4 i ND4L jest regulowana przez mechanizm zależny od starzenia się komórek. Badając ekspresję genów nd2, nd4 i nd5 we wszystkich stadiach oogenezy *Drosophila melanogaster* Tourmente i wsp. [42] nie stwierdzili jednak znaczących różnic.

Badania białkowych produktów genów nd obejmowały identyfikację odpowiednich podjednostek oraz analizę fizykochemiczną. Podjednostki kompleksu I kodowane przez mt DNA wołu identyfikowano stosując zarówno przeciwciała [2, 43], jak i za pomocą określenia ich sekwencji aminokwasowej. W nielicznych przypadkach poznano strukturę II — rzędową łańcucha polipeptydowego podjednostek ND. Yagi [44] na przykład określił, że podjednostka ND2 zawiera 8 helis transbłonowych i posiada masę 30 kDa, a podjednostki ND4 i ND5 zawierają odpowiednio 14 i 15 helis transbłonowych . Wymienione fragmenty hydrofobowe charakteryzują się szczególnie dużą ilością konserwatywnych reszt aminokwasowych. Natomiast Moum i wsp. [29] w przedstawionym modelu białka ND6 postulują występowanie u ssaków i innych kręgowców 5 helis transbłonowych, oraz zróżnicowaną długość sekwencji łączącej domeny IV i V. Sugerują oni także większe podobieństwo sekwencji aminokwasowej tej podjednostki pomiędzy ptakami i rybami, niż pomiędzy ptakami i ssakami. W przypadku analizy zaburzeń chorobowych za które odpowiedzialne są między innymi zmiany w mt DNA, podjednostki ND identyfikowano stosując przeciwciała [45].

Masa cząsteczkowa podjednostek ND mieści się w granicach od 10 do 67 kDa. U człowieka produkty mitochondrialnych genów nd wykazują odpowiednio następujące masy cząsteczkowe: 35.7, 39, 13.2, 51.6, 67, 18.7 oraz 10.7 kDa [46]. Uważa się, że u zwierząt żadna z tych podjednostek nie jest związana

z centrami żelazowo — siarkowymi. Postuluje się jednak, że podjednostka ND1 wołu o wielkości 33 kDa może uczestniczyć w wiązaniu ubichinonu [2].

III-2. Geny nd grzybów

U grzybów do największych genów nd należy gen nd1. U *Podospora anserina* stwierdzono, że gen nd1 posiada 4 introny klasy I., które zawierają liczne otwarte ramki odczytu. Okazało się że istnieje związek pomiędzy występowaniem tych ramek odczytu u 23 szczepów *Podospora*, a obecnością wielu substytucji nukleotydowych w sąsiadujących ze sobą eksonach [47]. Cummings i wsp. [22] stwierdzili także, że intron genu nd4 *Podospora anserina* zawiera sekwencję tzw. dodekapeptydu, która jest częścią otwartej ramki odczytu kodującej białko maturazy. Wykryli oni również [24], że gen nd4L posiada kopię występującą w intronie grupy I tego genu, a rozmieszczony bezpośrednio za genem nd4L, gen nd5 zawiera 2 introny różnego typu; pierwszy z nich należy do grupy IC a drugi do grupy II.

Cechą charakterystyczną intronów klasy IC obecnych w mitochondrialnych genach nd grzybów jest pewne zróżnicowanie w budowie, polegające na obecności dodatkowych układów helikalnych w strukturze II-rzędowej genów nd1 i nd3; takich dodatkowych układów helikalnych nie stwierdza się w intronie genu nd4 [22].

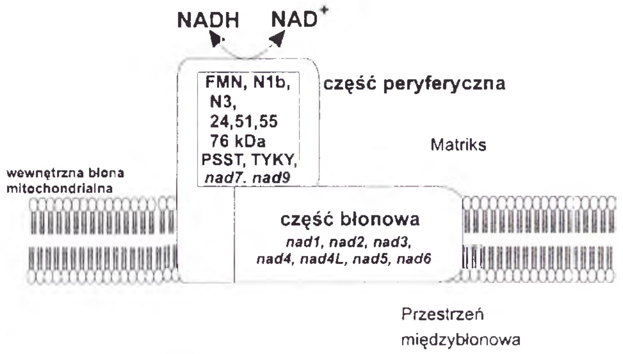
Geny nd4L i nd5 *N. crassa* które zachodzą na siebie i ulegają kotranskrypcji do mRNA o wielkości ok. 3200 zasad też zawierają introny. Introny tych genów są szczególnie stabilne po ich wycięciu z cząsteczki pre-mRNA [21]. Nelson i wsp. [21] stwierdzili, że zawierają one również otwarte ramki odczytu, w obrębie których znajdują się sekwencje powtórzone i konserwatywny motyw dodekapeptydowy.

Okazało się także, iż w mt DNA *N. crassa* występuje zarówno „natywny" gen nd2, jak i jego zduplikowane fragmenty, połączone ze sobą sekwencją palindromową o wielkości 37 pz. Obraz ekspresji genu nd2 różni się od jego niepełnych kopii: transkrypty zawierające gen nd2 mają wielkość 2.6, 3 i 5 kpz, a transkrypty zduplikowanych fragmentów genu — 2.05 oraz 2.3 kpz [23].

Podjednostkom ND przypisuje się czasami inne funkcje. Obrazują to między innymi wyniki uzyskane przez Hogue i wsp. [48]. Autorzy ci wyizolowali cDNA sztucznego białka fuzyjnego składającego się z centralnej i C końcowej części podjednostki ND4 człowieka, oraz N końcowej części białka GAL10 *Saccharomyces cerevisiae*, i wykazali jego obecność w błonie komórkowej drożdży. Sugerują oni, że podjednostka ND4 posiadająca prawdopodobnie 12 helis transbłonowych może funkcjonować jako transporter lub tworzyć kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej drożdży.

III-3. Geny *nad* roślin

Roślinna dehydrogenaza NADH wykazuje większą masę cząsteczkową niż odpowiedni enzym zwierząt i grzybów. Cechą charakterystyczną enzymu roślinnego jest możliwość czasowego i przestrzennego rozdzielenia części: hydrofilowej (peryferycznej) i hydrofobowej kompleksu I [49]. W części hydrofobowej występują podjednostki NAD1 do NAD6 oraz NAD4L, a podjednostki NAD7 i NAD9 znajdują się w części peryferycznej enzymu (Rys. 1).



Rys. 1. Rozmieszczenie podjednostek dehydrogenazy NADH — ubichinon wrażliwej na rotenon (kompleks I) w wewnętrznej błonie mitochondrialnej roślin. Podjednostki kodowane przez genom mitochondrialny oznaczono *kursywą*. N1 do N3 — centra żelazowo — siarkowe o znanej lokalizacji; FMN — mononukleotyd flawinowy; (na podstawie [151] – zmodyfikowano)

Kodujące je geny *nad* charakteryzują się ogólnie wysoką zachowawczością sekwencji u różnych gatunków roślin. Wyjątek jak dotychczas stanowi budowa genu *nad*2 buraka cukrowego [50]. Okazało się, że pierwsze 400 nukleotydów eksonu 4 genu *nad*2 posiada odmienną niż u innych roślin sekwencję nukleotydową. Z kolei sekwencje flankujące geny *nad* różnią się składem nukleotydowym nawet u blisko spokrewnionych gatunków [51-53].

Większość genów *nad* roślin posiada od 1 do 5 intronów kl. II, kodujących niekiedy białka maturaz. Odległości pomiędzy intronami w genach *nad* mogą sięgać nawet 300 kpz [54].

Chociaż wiele mitochondrialnych genów roślin ulega niezależnej od siebie ekspresji, niektóre sekwencje kodujące ulegają kotranskrypcji. Transkrypty genów *nad* mogą być również monocistronowe lub policistronowe, kiedy ulegają kotranskrypcji z innymi genami. Składanie transkryptów genów *nad* roślin jest wyjątkowo skomplikowane, gdyż może

się odbywać nie tylko w układzie *cis*, ale również *trans*. Morawala-Patell i wsp. [55] uważają, że ważną rolę w składaniu eksonów transkryptów genów *nad* w układzie *trans* odgrywa domena IV intronów. Haouazine i wsp. [56] proponują dwa modele dojrzewania i obróbki kotranskryptu *nad*1 — *nad*6 pszenicy. W pierwszym modelu zakładają, że gen *nad*6 w trakcie tego procesu oddziałuje właśnie z domeną IV intronu rozdzielającego eksony IV i V *nad*1; w drugim natomiast, który autorzy faworyzują, nie przewidują takiego oddziaływania. Inni autorzy [57] sądzą, że na odpowiedni przebieg procesu składania w układzie *trans* mają wpływ między innymi duplikacje eksonów. Dotychczas nie znaleziono jednak żadnych reguł wskazujących na korelację pomiędzy liczbą eksonów a typem składania. Niektóre geny *nad*, np. *nad*1, 2 i 5 posiadają zwiększoną liczbę eksonów i składanie transkryptów tych genów zachodzi zarówno w systemie *cis*, jak i *trans*. Początek i koniec transkryptu niektórych genów *nad* obejmuje czasami kilka miejsc. Haouazine i wsp. [58] wykryli na przykład, że u pszenicy na 3' końcu transkryptu *nad*6 są 3 miejsca zakończenia transkrypcji, a 5' koniec tego mRNA jest położony 375 nukleotydów przed kodonem „AUG" *nad*6.

Nieobecność niektórych podjednostek NAD powoduje, że fizjologiczne funkcje dehydrogenazy NADH ulegają znacznemu ograniczeniu. W 1995 r. Pla i wsp. [59] badając mutanta CMS *Nicotiana sylvestris* stwierdzili brak podjednostki NAD7 w wyniku delecji w mt DNA tej rośliny. Delecja spowodowała również utratę 2 dalszych podjednostek i ograniczenie aktywności dehydrogenazy NADH. Z kolei Gutierres i wsp. [60] pracując z mutantem CMS II *N. sylvestris* stwierdzili utratę podjednostki NAD1. Jest to pierwszy zbadany roślinny mutant nie zawierający tej podjednostki. Autorzy sugerują, że za mutację tą odpowiedzialna jest translacja transkryptu genu *nad*1; w mitochondriach mutanta nie stwierdzono obecności dojrzałych mRNA *nad*1. Obniżenie aktywności dehydrogenazy NADH o 90% wynika prawdopodobnie z faktu, że podjednostka NAD1 posiada miejsce wiążące ubichinon. Ostatnio Duby i wsp. [61] pracując z mutantami *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzili między innymi, że brak genu *nad*4 i 3' końca genu *nad*5 też powoduje obniżenie aktywności enzymatycznej dehydrogenazy NADH. Znany od dawna mutant NCS 2, wykazujący częściową delecję genu *nad*4 również posiada obniżoną aktywność dehydrogenazy NADH. Wszystkie te mutanty nie są letalne, gdyż zawierają genomy dzikie i zmutowane, a ponadto przepływ elektronów w ramach łańcucha oddechowego kompensują dehydrogenazy NADH niewrażliwe na rotenon.

Sekwencje genów nd i *nad* podobnie jak inne sekwencje mt DNA są wykorzystywane w badaniach filogenetycznych [62-64].

Ponieważ ilość informacji na temat budowy i ekspresji roślinnych genów *nad* jest znaczna i różnorodna, w tabeli 1 przedstawiono najbardziej istotne dane dotyczące charakterystyki tych genów.

IV. Redagowanie transkryptów genów mitochondrialnych

Redagowanie (ang. *editing*) — proces, który modyfikuje informację genetyczną zawartą w transkrypcie poprzez wymianę, przyłączenie lub usunięcie nukleotydów — występuje u wielu grup eukariontów [65-67]. Zmiany takie zaobserwowano w mRNA, tRNA i rRNA dotychczas tylko u eukariontów. Najczęściej redagowane są sekwencje kodujące, a w mniejszym stopniu sekwencje je oskrzydlające i introny. Redagowanie opisano początkowo u pierwotniaków, jako proces prowadzący do delecji lub insercji urydyn. Obecnie wiadomo, że redagowanie może obejmować również nukleotydy takie, jak: A, G, C i prawdopodobnie I [68] oraz, że zamiana C-U zachodzi poprzez deaminację C, a zamiana U-C – przez transaminację [68, 69]. Williams i wsp. [70] sądzą, że na proces redagowania nie ma wpływu struktura II-rzędowa. Niektórzy autorzy opierając się na fakcie, że chloroplastowe sekwencje przenoszone do mitochondrium i odwrotnie nie są redagowane, sugerują odrębny mechanizm redagowania dla każdej z tych organelli [71], inni natomiast [68] uważają, że mechanizm redagowania w chloroplastach i mitochondriach chociaż nie jest identyczny, bo wymaga pewnych specyficznych dla danych organelli czynników, wykazuje jednak pewne podobieństwa.

Redagowanie w mitochondriach roślin okrytozalążkowych odkryto w 1989 r., a w dwa lata później — w chloroplastach tych roślin [72-73]. Podobieństwo systemów redagowania RNA mitochondriów i chloroplastów wynika z tego, że w trakcie tego procesu następuje głównie zamiana C-U i proces ten nie wykazuje polarności [71], tymczasem podczas redagowania jądrowych mRNA zwierząt i człowieka zachodzi również deaminacja adenozyny [14]. W transkryptach genów chloroplastowych jest znacznie mniej miejsc redagowania, niż w mitochondriach, co ma związek przypuszczalnie z szybszą ewolucją plastomu [74]. Karcher i wsp. [74] postulują pewien wpływ plastydowego aparatu translacji na pro-

cesy redagowania, gdyż podwyższona temperatura i zahamowanie syntezy białka hamuje proces redagowania. Maier i wsp. [68] sugerują jednak, że wszystkie białkowe składniki konieczne do redagowania w plastydach, są kodowane przez genom jądrowy i importowane do organelli. Nie wiadomo, czy podobna sytuacja dotyczy mitochondriów.

Redagowanie występuje zarówno w normalnych, jak i chimerycznych transkryptach, ale zaobserwowano, że ulega ono ograniczeniu w roślinach z feno-

Tabela 1
Niektóre cechy roślinnych genów *nad*

Nazwa genu	Badany materiał	Ilość kopii	Ilość intronów	Typ składania eksonów	Wielkość transkryptów (kpz)	Uwagi
*nad*1	Zielenice	1	--	--		[119]
	Porostnica	1	--	--		[152]
	Pszenica	1	4	*trans,cis*	2-3.5	[94, 95] sekw. mat-r
	Bób	1	4	*cis*	2.5-3.8	[120] sekw.mat-r
	Wiesiołek	1	4	*trans,cis*	1.4-7.0	[121, 92] kotranskr. z *rps*13 i *cox*I
	Ziemniak	1	1	*cis*		[95] sekw. mat-r
	Tytoń	1	4			[122, 60] rearanżacja eksonu I – nieaktywny kompl. I [123]
	Słonecznik	1	4	*trans,cis*		[124] korelacja z CMS
	Petunia	1	4	*trans,cis*		[15]
	Rzodkiewnik	1				
*nad*2	Porostnica	1	1	*cis*	1.5-9.6	[125] kotranskrypcja z *nad*4 i *nad*5
	Pszenica	1	4	*trans,cis*		[55]
	Rzepak	1	4	*trans,cis*		[126]
	Burak	1	--	--	1.7-4.9	[50]
	Wiesiołek	1	4	*trans,cis*	1.4-1.7	[120, 127]
	Rzodkiewnik	1	4	*trans,cis*	1.5-5.3	[97] 2 kodony start
*nad*3	Ponad 20 gat. roślin	1 lub 2	Tylko 1 u porostnicy	U porostnicy *cis*	Wielkość transkryptów u roślin nasiennych: 0.9-3.2	[51-53, 75, 99, 100-101, 103-105, 122, 128-131] Kotranskrypcja zwykle z *rps*12, u wiesiołka z *rpl*5, u ryżu z *rps*3 i *ccb*206; u petunii i ziemniaka korelacja z CMS; 2 kopie u *N. sylvestris*: jedno ulega kotranskr. z eksonem I *nad*1
*nad*4	Zielenice	1;	1	*cis*	1.25-1.4	[132] Kotranskrypcja z *cob*
	Porostnica	1	1	*cis*	3-5.4	[125] kotranskrypcja z *nad*2 i *nad*5
	Pszenica	1	3	*cis*	1.8-2.5	[106-107]
	Kukurydza	1	3	*cis*	2-3.4	[133] korelacja z CMS
	Ryż	1	3			[134] intron I większy od odpow. intronu pszenicy i zaw. sekw. Powtórzoną
	Sałata	1	1	*cis*	1.6-3.2	[108]
	Rzodkiewnik	1	3	*cis*		[15]
	Soja	1	>1			[135]
	Rzepak	1	>1		2.2	[64] korelacja z CMS

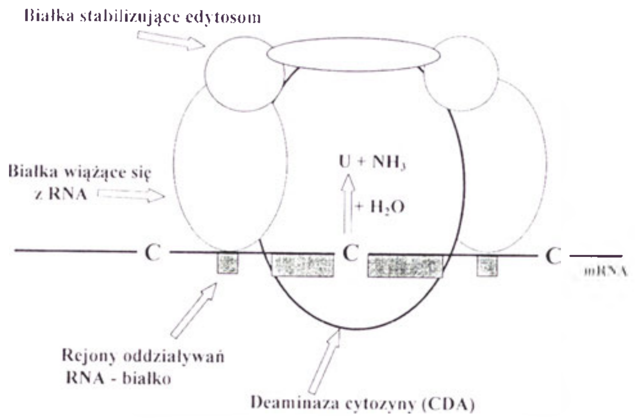
*nad*4L	Glony	1;	--	--		[136-137] nieobecny u *Ch. Reinhardtii*
	Porostnica	1	2	*cis*		[131]
	Rzodkiewnik	1	0	--	0.8-4.4	[109]
*nad*5	Zielenice	1	2			[138]
	Wątrobowce	1 lub 2	1	*cis,trans*	2.1-9.6	[66, 125] porostnica: kotranskrypcja *nad*2 i *nad*4
	Paprotniki	1			0.3-4.4	[139] najmniejszy intron gr. II roślin
	Wiele gat. roślin nasiennych	1 lub 2	2 do 4		0.3-4.5	[110, 134, 140-147] kotranskrypcja: wiesiołek z genami rRNA, jabłoń z *atp*9
*nad*6	ponad 20 gat. roślin	1 lub 2	--	--	1.2-2.9;	[56, 58, 111, 131, 148-149] 8 znanych sekwencji; kotranskrypcja: pszenica z eksonem IV *nad*1, kukurydza z *atp*6
*nad*7	Glony	1	--	--		[59]
	Porostnica ,	2	2	*cis*	9.6 i 16;	[25] jedna kopia w jądrze; w mitochondriach pseudogen ulegający transkrypcji
	Pszenica,	1	4	*cis*	1.7;	[113]
	ziemniak,	1	4	*cis*		[112]
	tytoń	1	4	*cis*		[59] delecja 2 eksonów w CMS
*nad*9	Pszenica,	1;	--	--	0.9-1.8	[115]
	Ryż	1	--	--	0.69-3.0	[118] kotranskrypcja z *ndh*K, *ndhJ* z ct DNA
	Burak,	1	--	--	1	[150]
	Ziemniak,	1	--	--	0.9-1.8	[116]
	Rzodkiewnik	1	--	--		[15]

typową cechą CMS [75]. Redagowania transkryptów organellowych nie wykryto dotychczas u porostnic (*Marchantiidae*) i glonów [66, 76]. U niektórych mszaków (glewiki) występuje w znacznym odsetku proces odwrotnego redagowania: zamiana U-C [66, 69]. Maier i wsp. [68] szacują, że w mitochondriach roślinnych 86% wszystkich przypadków redagowania zmienia kodony aminokwasów. Pozostałe zmiany, tzw. redagowanie „ciche" — nie zmieniające aminokwasów — z niejasnych powodów nadal utrzymuje się ewolucyjnie. Shields i wsp. [77] zwrócili również uwagę na fakt, że 24 % miejsc redagowania C-U w pewnych gatunkach jest „preredagowanych" tzn. wykazuje obecność w sekwencji genomowej T. Autorzy ci sądzą, że zamiana genomowych C w T może się przyczyniać do przyspieszonej ewolucji genów. Uważają oni jednak, że redagowanie wywiera małą presję selekcyjną w przypadku większości zmienianych miejsc w czasie ewolucji. Redagowanie w mitochondriach może przywracać także występowanie konserwatywnych aminokwasów, kreować kodony „start" lub „stop", albo oba jednocześnie [78].

Częściowo redagowane transkrypty, będące produktami przejściowymi dojrzewania RNA, występują w mitochondriach niemal wszystkich zbadanych gatunków roślin. Ilość częściowo zredagowanych mRNA zależy od stopnia dojrzałości transkryptów [68]. Mniej redagowane są cząsteczki, które są przeznaczone do procesu składania RNA (ang. *splicing*), natomiast cząsteczki które uległy temu procesowi są redagowane w większym stopniu. Lu i wsp. [79] wykazali, że częściowo redagowane mRNA mogą ulegać translacji, a odpowiednie białko może się akumulować na poziomie wykrywalnym metodami immunologicznymi. Prowadzi to do powstania polimorfizmu białek. Autorzy sądzą jednak, że zjawisko translacji takich mRNA może być specyficzne dla określonych gatunków roślin. W mitochondriach roślin selekcja redagowanych C jest wysoce specyficzna i jak sądzą Mulligan i wsp. [80] oraz Kubo i Kadowaki [71] zależy ona

między innymi od sekwencji rejonu flankującego redagowany nukleotyd od strony 5'.

Jednym z zagadnień związanych z redagowaniem jest wyjaśnienie, w jaki sposób dochodzi do oddziaływania RNA — białko. Zakładając udział w redagowaniu cząsteczek gRNA (ang. *guide* RNA), które mogą być obecne w mitochondriach w bardzo małym stężeniu, fakt znacznej liczby miejsc redagowania skłania do przypuszczenia, że nie każde z nich jest rozpoznawane przez odrębne białka [70]. Problem udziału czynników białkowych w redagowaniu będzie mógł być lepiej poznany gdy będzie przeprowadzona odpowiednia analiza *in vitro*. Próby opracowania takiego „systemu" podjęli Y u i w s p . [81] dla grochu w przypadku redagowania typu C-U, natomiast B l a n c i w s p . [82] opisali podobny eksperyment z zastosowaniem ekstraktu z mitochondriów zarodków pszenicy. Postulują oni, że białkowy kompleks redagujący (edytosom) składałby się z deaminazy cytozyny, białek wiążących się z RNA oraz białek stabilizujących cały układ (Rys. 2). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń autorzy sugerują, że edytosom zawiera nie jedno, ale kilka białek niezbędnych do pojawienia się aktywności redagującej. F a i v r e - N i t s c h k e i w s p . [83] scharakteryzowali dużą rodzinę genów deaminaz cytozyny występujących w mitochondriach rzodkiewnika. Wykazują one wysoki stopień homologii z ich bakteryjnymi odpowiednikami, a sześć z siedmiu poznanych białek posiada typowy motyw aminokwasowy charakterystyczny dla miejsca aktywnego deaminaz.



Rys. 2. Schemat kompleksu edytującego (edytosomu) w mitochondriach roślin; (na podstawie [82] – zmodyfikowano)

Uważa się, że wiele przypadków redagowania mogło się wykształcić niezależnie od siebie. Zakładając, że proces redagowania jest bardzo stary ewolucyjnie, postuluje się [69], że mógł on zachodzić już u prokariotycznych przodków organelli. B r e n n i c k e i w s p . [67] sądzą jednak, że większość procesów redagowania obejmująca zarówno jądrowe, jak i organellowe transkrypty jest stosunkowo młodych ewolucyjnie i powstała raczej niezależnie od siebie. Fakt występowania redagowania transkryptów mitochondrialnych u mszaków przemawia także za tym, że redagowanie u roślin sięga czasów pojawienia się roślin lądowych i że proces ten w pewien sposób przyspieszył ewolucję roślin telomowych [76].

IV-1. Redagowanie transkryptów genów nd pierwotniaków

Proces redagowania transkryptów nd pierwotniaków, w szczególności nd7 i nd8 trypanosom, zachodzi zarówno poprzez tworzenie kodonów „start" i „stop", jak również poprzez addycje nukleotydów w obrębie cząsteczek RNA [84-85]. Redagowanie transkryptów genów nd trypanosom zależy od wielu czynników. W przypadku transkryptów nd1 *Trypanosoma brucei* i *Crithidia fasciculata* okazało się, że nie ulegają one redagowaniu w obszarze kodującym, a jedynie w obrębie ogona poli(A) [86]. Z kolei u wolno żyjącego pierwotniaka *Bodo saltans*, transkrypty nd5 są redagowane w rejonie kodującym [87]. S o u z a i w s p . [18] badając redagowanie transkryptów genu nd7 stwierdzili, że poziom redagowania nie zmieniał się w cyklu życiowym *T. brucei*, ale pula nieredagowanych transkryptów była wyższa u osobników żyjących we krwi. W 1992 r. zidentyfikowano geny gRNA redagujące transkrypty genów nd7 i nd8 i wykryto, że zależna od okresu rozwoju regulacja tego procesu nie jest związana z aktualną ilością gRNA [88]. B l u m i S i m p s o n [89] zainteresowali się początkowym etapem redagowania transkryptów genu nd7. Dążąc do poznania zaangażowania gRNA w tym procesie autorzy zastosowali chimeryczną cząsteczkę zawierającą syntetyczny preredagowany mRNA i gRNA dla kryptogenu nd7 *Leishmania tarentolae*, oraz ekstrakt z mitochondriów. W wyniku tych badań stwierdzili, że preredagowana część nie wpływa na redagowanie w innych miejscach cząsteczki. H e r m a n n i w s p . [90] rozwinęli dalej te badania i skonstruowali trójwymiarowy model układu: gRNA — transkrypt genu nd7. Pozwoliło im to stwierdzić, że gRNA znajduje się wewnątrz rybonukleinowego kompleksu odpowiedzialnego za redagowanie.

Generalnie uważa się, że redagowanie transkryptów genów nd trypanosom zachodzi niezależnie od innych procesów dojrzewania mRNA [91].

IV-2. Redagowanie transkryptów genów *nad* roślin

Prawie wszystkie mRNA mitochondriów roślinnych ulegają redagowaniu, w tym również transkrypty genów *nad*. Jak pokazano w tabeli 2, ilość miejsc redagowania w transkryptach genów *nad* jest dość znaczna.

Redagowanie polega najczęściej na zamianie C-U. Niektóre z opisanych przypadków odwrotnej zamiany U-C wymagają jeszcze weryfikacji. Redagowanie prowadzi czasami do powstawania kodonów „start". W zależności od badanego materiału redagowanie transkryptów genów *nad* wykazuje pewne cechy charakterystyczne. U niektórych roślin, na przykład u wiesiołka, redagowaniu ulega nie tylko 4 z 5 eksonów genu *nad*1, ale i pojedyńczy intron [92]. Charakterystyczną cechą redagowania genu *nad*1 wiesiołka jest również znaczny odsetek cytozyn ulegających „cichemu" redagowaniu. W roślinie tej istnieje wyraźny związek pomiędzy redagowaniem a splicingiem. Usunięcie intronu z *nad*1 wymaga najpierw redagowania domeny VI intronu . Natomiast w transkryptach *nad*1 petunii usunięcie intronów nie jest wymagane do przebiegu procesu redagowania [93].

W transkryptach pszenicy każdy ekson *nad*1 ulega redagowaniu, a szczególny nadmiar miejsc redagowania zawiera ekson III [94]. Redagowanie intronów genu *nad*1 zachodzi też w obrębie sekwencji mat-r pszenicy i ziemniaka i dotyczy 13-15 konwersji C-U, które zmieniają charakter potencjalnych domen kodowanych maturaz [95].

Redagowanie transkryptów genu *nad*2 prowadzi nie tylko do zmian aminokwasów, ale również do

Tabela 2
Obraz redagowania transkryptów genów *nad* roślin

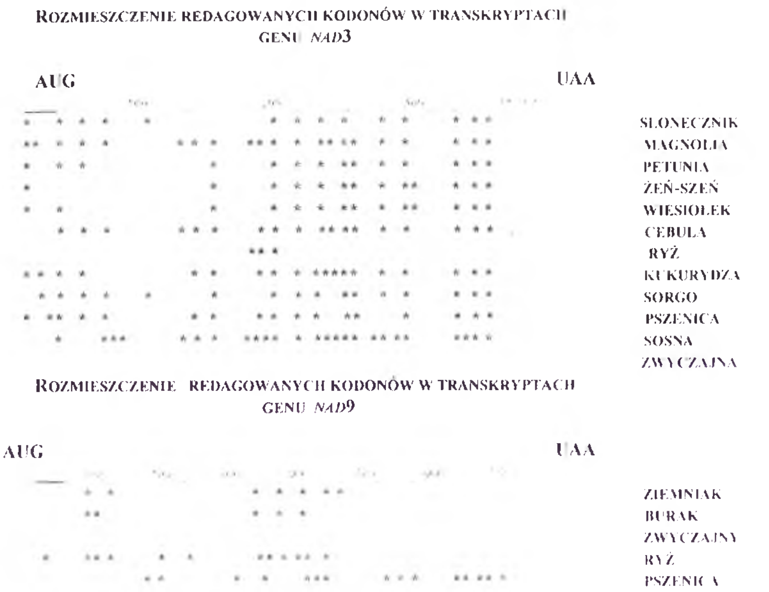
Gen	Badany materiał	Liczba miejsc redagowania	Uwagi
*nad*1	Pszenica	17	[94,95] redagowanie generuje kodon „start"
	Ziemniak		[95] redagowanie sekwencji mat-r (15 miejsc)
	Wiesiołek	28	[121]redagowanie mat-r; redag. generuje „start"
	Petunia	23	[124]
*nad*2	Pszenica	36	[55]
	Wiesiołek	36	[96,127] w tym redagowanie intronów
	Rzodkiewnik	33	[97] w tym redagowanie intronów
*nad*3	Sosna	27	[100] częściowe redagowanie
	Pszenica	21	[103] częściowe redagowanie; korelacja: redagowanie - dojrzewanie mRNA
	Ryż	5	[99]
	Kukurydza	22	[104] częściowe redag.; kultury zawiesinowe;
	Sorgo	19	[75]
	Wiesiołek	16	[102] częściowe redagowanie
	Żeń-szeń	15	[128] redagowanie zbliżone do wiesiołka
	Petunia	19	[105] częściowe redagowanie
	Rzepak	10	[98] redagowanie różnicuje rodzaj *Brassica*
	Magnolia	23	[51] częściowe redagowanie
	Słonecznik	16	[51] częściowe redagowanie
	Czosnek	21	[51] częściowe redagowanie
*nad*4	Pszenica	23	[106] całkowite redagowanie
	Sałata	16	[108] całkowite redagowanie
	Rzepa	36	[108] odmienna ilość miejsc redag. w eksonach w porównaniu z pszenicą i sałatą
*nad*4L	Rzodkiewnik	9	[109] częściowe redagowanie
*nad*5	Wątrobowce:		[66] redagowanie badano we fragmencie transkryptu genu *nad*5
	glewiki	37-50	
	jungermaniowce	2-21	
	Mchy	1-9	
	Wiesiołek	27	[110]
	Rzodkiewnik	9	[110]
*nad*6	Pszenica	15	[58]
	Kukurydza	12	[111]
*nad*7	Pszenica	32	[113] niektóre zmiany są częściowe
	Ziemniak	3	[112] redagowanie I eksonu
*nad*9	Pszenica	15	[115]
	Ryż	12	[118]
	Burak zwyczajny	5	[150]
	Ziemniak	7	[116]

tzw. „cichych" konwersji. Redagowanie tych ostatnich wykryto u wiesiołka [96]. W intronach genu *nad*2 wiesiołka składanych w systemie *trans* stwierdzono występowanie 3 miejsc redagowania. Podobnie jak w przypadku genu *nad*1 stwierdzono, że redagowanie jest konieczne do prawidłowego wycięcia intronów [96]. Okazało się również, że 27 miejsc redagowania wiesiołka, pszenicy i rzodkiewnika jest wspólnych [97].

W transkryptach genu *nad*3 dotychczas zbadanych gatunków roślin najwięcej zmian typu C — U występuje w centralnym i 3' końcowym rejonie mRNA (Rys. 3). U okrytozalążkowych, z wyjątkiem ryżu [51, 98, 99] obraz redagowania jest zachowawczy. Konwersji ulega zazwyczaj od 10-23 miejsc u okrytozalążkowych, natomiast u nagozalążkowych — sosny zwyczajnej, redagowanie mRNA *nad*3 obejmuje aż 27 pozycji [100]. Wyjątkowy przypadek stanowi rzodkiew odmiany płodnej i męskosterylnej 'Ogura', w których mitochondrialne transkrypty *nad*3 nie ulegają w ogóle redagowaniu [101]. Charakterystyczną cechą towarzyszącą ekspresji genu *nad*3 roślin jest występowanie procesu częściowego redagowania [51, 100, 102-105]. W niektórych transkryptach pszenicy stwierdzono występowanie delecji w miejscach redagowania lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie. G u a l b e r t o i w s p . [103] sugerują, że delecje te są konsekwencją procesu redagowania. Jak wykazały szczegółowe badania przeprowadzone na siewkach i kulturach zawiesinowych kukurydzy [104] stopień redagowania mRNA *nad*3 zmienia się w zależności od warunków hodowli kultur zawiesinowych i od wieku siewek. W i l s o n i H a n s o n [105] analizując stopień redagowania 4 różnych genotypów petunii zauważyli, że genom jądrowy ma wpływ na redagowanie; takiego wpływu nie obserwuje się jednak w relacji redagowania poszczególnych miejsc. Zaobserwowano przy tym, że niektóre miejsca w sekwencji mRNA *nad*3 są redagowane z większą częstotliwością, inne natomiast z mniejszą [98, 105]. Badano również wpływ sterylnej i płodnej cytoplazmy na obraz redagowania transkryptów *nad*3. Jak wynika z badań przeprowadzonych z etiolowanymi siewkami i pylnikami sorgo [75] nie stwierdza się różnic w redagowaniu tych dwóch typów cytoplazm. Ponieważ gen *nad*3 w większości badanych przypadków ulega kotranskrypcji z genem *rps*12 badano także rejon między tymi genami. U słonecznika rejon ten był redagowany w jednym miejscu [51].

Badając redagowanie transkryptów genu *nad*4 pszenicy [106, 107], rzepy i sałaty [108] i stwierdzono, że obraz redagowania jest podobny ale nieidentyczny. U pszenicy redagowanie występuje głównie w I i IV eksonie. Sugeruje się, że to nierównomierne rozmieszczenie miejsc redagowania ma związek z budową podjednostki NAD4 i z ewolucyjnymi procesami „tasowania" eksonów. W porównaniu z obrazem redagowania innych transkryptów *nad* proces podwójnego redagowania kodonów mRNA *nad*4 występuje rzadko [106, 108]. U pszenicy okazało się również, że redagowanie połączenia eksonów II i III mRNA zapewnia ciągłość ramki odczytu [107].

Redagowanie stwierdzono również w transkryptach *nad*4L. Transkrypty podjednostki NAD4L rzodkiewnika ulegają redagowaniu, które zmienia charakter 9 kodonów. Okazało się jednak, że spośród dziesięciu analizowanych klonów cDNA *nad*4L tego gatunku, cztery z nich były identyczne i całkowicie redagowane, pozostałe zawierały od jednego do kil-



Rys. 3. Przykładowe rozmieszczenie miejsc redagowania w transkryptach genów *nad* na przykładzie *nad*3 i *nad*9. Gwiazdkami (*) oznaczono pozycje redagowanych kodonów na całej długości odpowiedniego mRNA.

ku pozycji nieredagowanych. Badając to zagadnienie Brandt i wsp. [109] nie znaleźli przyczyn częściowego redagowania tego transkryptu.

Redagowanie genu *nad*5 badano zarówno u roślin nasiennych, jak i mszaków. W przypadku tych ostatnich są to jedyne informacje na ten temat. Badając centralny rejon genu *nad*5 Steinhauser i wsp. [66] nie wykryli jednak redagowania u wątrobowców *Marchantiidae*. Zanalizowano także 30 przedstawicieli mchów. Stwierdzono u nich typowe redagowanie typu C-U powodujące głównie zamianę kodonów serynowych i argininowych w kodony fenyloalaninowe, leucynowe, cysteinowe i tryptofanowe. Okazało się również, że u glewików redagowanie mRNA *nad*5 może zmieniać aż 6 % kodonów także w wyniku zamiany U-C, co powoduje przekształcenie wewnętrznych kodonów „stop" w kodony glutaminowe i argininowe [66]. Transkrypty *nad*5 u glewików w porównaniu z innymi roślinami okazały się najczęściej redagowanymi transkryptami *nad*. Z kolei u roślin okrytozalążkowych, jak wiesiołek i rzodkiewnik, które jako jedyne były dotychczas poddane badaniom wszystkie eksony ulegają redagowaniu z wyjątkiem eksonu V. U wiesiołka redagowaniu ulegają też introny rozdzielające eksony I i II oraz IV i V [110].

Badając redagowanie transkryptów genu *nad*6 pszenicy Haouazine i wsp. [58] wykryli pewne cechy charakterystyczne dla mRNA tej rośliny. Okazało się, że redagowanie 2 kodonów pszenicy jest typu „cichego", a w 4 dalszych zmianie podlegają 2 pozycje w kodonie. Miejsca redagowania transkryptów *nad*6 kukurydzy odpowiadają znanym pozycjom w pszenicy, ale z kolei u kukurydzy wykryto znaczny odsetek częściowo redagowanych mRNA [111].

Jak wynika z dotychczasowych badań, zmiany towarzyszące redagowaniu transkryptów *nad*6 pszenicy i kukurydzy obejmują zarówno konwersje kodonów prolinowych, serynowych i histydynowych odpowiednio w kodony fenyloalaninowe, leucynowe i tyrozynowe, jak również zmiany „ciche" w kodonach leucynowych.

Ilość miejsc redagowania w transkryptach genu *nad*7 wyraźnie zależy od badanego materiału. Redagowaniu w 1 eksonie transkryptu genu *nad*7 ziemniaka podlegają 3 kodony [112]. W mRNA *nad*7 pszenicy natomiast redagowanie powoduje aż 32 konwersje C-U w 4 z 5 eksonów. 27 z tych 32 zmian dotyczy redagowania zmieniającego sens kodonów. Bonen i wsp. [113] szacują, że wśród pozostałych zmian „cichych" niektóre są częściowo redagowane. Badając wpływ okresu rozwoju na redagowanie intronów *nad*7 pszenicy stwierdzono, że chociaż redagowanie intronów genu *nad*7 pszenicy może wpływać na wydajność procesów dojrzewania mRNA nie jest to jednak proces niezbędny do zachodzenia dojrzewania [114].

Redagowanie badano również w transkryptach genu *nad*9. Dotychczasowe dane dotyczą 4 gatunków roślin nasiennych. Okazało się, że u roślin jednoliściennych, szczególnie u pszenicy, w porównaniu z roślinami dwuliściennymi więcej miejsc redagowania transkryptów *nad*9 występuje bliżej końca 3' (Rys. 3). Ciekawe, że wszystkie dotychczas zidentyfikowane zmiany „ciche" w transkryptach genu *nad*9 występują wyłącznie u pszenicy i dotyczą głównie kodonów serynowych i leucynowych. Pozostałe zmiany C-U powodują konwersje kodonów serynowych i prolinowych w kodony fenyloalaninowe i leucynowe [115]. Najwięcej uwagi poświęcono redagowaniu transkryptów *nad*9 ziemniaka, gdzie występują częściowo i w pełni redagowane transkrypty. Redagowanie transkryptów *nad*9 ziemniaka było badane w 2 laboratoriach [116-117]. Grohmann i wsp. [116] opierając się na wynikach sekwencjonowania peptydów uważają, że tylko peptydy podjednostki NAD9 odpowiadające w pełni zredagowanym transkryptom są obecne w dehydrogenazie NADH. Częściowo redagowane mRNA *nad*9 mogą nie ulegać translacji w wyniku pretranslacyjnej selekcji lub powstałe z nich białko może ulegać szybkiej proteolizie. Lu i Hanson [117] na podstawie swoich wyników uzyskanych z zastosowaniem inhibitorów translacji uważają, że częściowo redagowane transkrypty mogą ulegać translacji, ale do ich wykrycia wymagane są czulsze metody immunologiczne. W związku z tym uważają oni, że nie musi istnieć specjalny mechanizm selekcji na mitorybosomach. Analizując miejsca redagowania mRNA *nad*9 roślin jednoliściennych i dwuliściennych, jak również wydedukowane sekwencje białka podjednostki NAD9 stwierdzono [118], że rośliny dwuliścienne (burak i ziemniak) zawierają mniej miejsc redagowania, ale wszystkie one odpowiadają miejscom występującym u jednoliściennych.

V. Uwagi końcowe

Dane przedstawione w artykule wskazują, ze organizacja, budowa i ekspresja genów nd i *nad* wykazuje zróżnicowanie w poszczególnych grupach organizmów. Zróżnicowanie to dotyczy przede wszystkim obrazu ekspresji, natomiast więcej cech zachowawczych w ramach poszczególnych genów nd i *nad* występuje w budowie genów i ich liczbie kopii.

Czynnikiem, który może wpływać na zróżnicowanie ekspresji mitochondrialnych genów podjednostek dehydrogenazy NADH kompleksu I łańcucha oddechowego jest miedzy innymi redagowanie.

Redagowanie, które występuje najczęściej w transkryptach mitochondrialnych, a rzadziej w chloroplastowych i jądrowych, w dwóch pierwszych przypadkach wykazuje pewne cechy wspólne, jak: występowanie zamiany C-U, preferencja drugiej pozycji kodonu w redagowaniu, preferencja konwersji pewnych kodonów oraz redagowanie głównie sekwencji mRNA.

Do grupy najczęściej redagowanych transkryptów genów mitochondrialnych należą mRNA genów *nad*. Stopień redagowania transkryptów genów *nad* może się zmieniać w zależności od gatunku rośliny, rodzaju tkanki, stadium rozwoju i warunków hodowli roślin. Proces ten wydaje się być skorelowany z dojrzewaniem transkryptów i zachodzi nie tylko w sekwencjach eksonów, ale również intronów.

Chociaż uważa się, że częściowo zredagowane transkrypty *nad* mogą ulegać translacji, co generowałoby pewien polimorfizm polipeptydów NAD, to ze względu na małą ilość danych, zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Podziękowanie

Praca finansowana z projektu badawczego nr 6 PO4B 018 13 Komitetu Badań Naukowych.
Prof. dr hab. Halinie Augustyniak dziękuję za stymulację i sugestie podczas przygotowywania niniejszego artykułu.

Artykuł otrzymano 13 grudnia 1999 r.
Zaakceptowano do druku 28 lutego 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Heiser V, Brennicke A, Grohmann L (1996) *Plant Mol Biol* **31:** 1195-1204
2. Walker JE (1992) *Quater Rev Biophys* **25:** 254-324
3. Rasmusson AG, Mendel-Hartvig J, Moller IM, Wiskich JT (1994) *Physiol Plant* **90:** 607-615
4. Laterme S, Boutry M (1993) *Plant Physiol* **102:** 435-443
5. Herz V, Schroeder W, Liddel A, Leaver CJ, Brennicke A, Grohmann L (1994) *J Biol Chem* **269:** 2263-2269
6. Combettes B, Grienenberger JM (1999) *Biochimie* **81:** 645-653
7. Schmidt-Bleck K, Heiser V, Thieck O, Brennicke A, Grohmann L (1997) *Mol Biol Genet* **253:** 448-454
8. Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D (1991) *Eur J Biochem* **197:** 563-576
9. Weidner U, Geier S, Ptock A, Friedrich T, Leif H, Weiss H (1993) *J Mol Biol* **233:** 109-122
10. Szymański M, Barciszewski J (1990) *Post Biochem* **36:** 2-4
11. Żekanowski C (1992) *Post Bioch* **38:** 156-163
12. Żekanowski C (1994) *Biotechnologia* **1:** 109-120
13. Rurek M (1994) *Post Bioch Kom* **21:** 391-394
14. Kostyrko A, Trzeciak W (1998) *Post Bioch* **44:** 94-101
15. Unseld M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A (1997) *Nat Genet* **15:** 57-61
16. Pritchard AE, Seilhamer JJ, Mahalingam R, Sable CL, Venuti SE, Cummings DJ (1990) *Nucl Acids Res* **18:** 173-180
17. Simpson L, Neckelman N, De La Cruz VF, Simpson AM, Feagin JE, Jasmer DP, Stuart K (1987) *J Biol Chem* **262:** 6182-6196
18. Souza AE, Shu HH, Read LK, Myler PJ, Stuart KD (1993) *Mol Cell Biol* **13:** 6832-6840
19. Maslov DA, Nawathean P, Scheel J (1999) *Mol Biochem Parasitol* **99:** 207-221
20. Burger G, Plante I, Lonergan KM, Gray MW (1995) *J Mol Biol* **245:** 522-537
21. Nelson MA, Macino G (1987) *Mol Gen Genet* **206:** 307-317
22. Cummings DJ, Domenico JM (1988) *J Mol Biol* **204:** 815-839
23. Agsteribbe E, Hartog M, de Vries H (1989) *Curr Genet* **15:** 57-62
24. Cummings DJ, Michel F, Domenico JM, McNally KL (1990) *J Mol Biol* **212:** 269-286
25. Takemura M, Nozato N, Oda K, Kobayashi Y, Fukuzawa H, Ohyama K (1995) *Mol Gen Genet* **247:** 565-570
26. Kaminura N, Ishii S, Liandong M, Shay JW (1989) *J Mol Biol* **210:** 703-707
27. Savre-Train I, Piątyszek MA, Shay JW (1992) *Hum Mol Genet* **1:** 203-204
28. Bai Y, Attardi G (1998) *EMBO J* **17:** 4848-4858
29. Moum T, Willassen NP, Johansen S (1994) *Curr Genet* **25:** 554-557
30. Xu X, Janke A, Arnason U (1996) *Mol Biol Evol* **13:** 1167-1173
31. Arnason U, Gullberg A, Widegren B (1991) *J Mol Evol* **33:** 556-568
32. Arnason U, Johnsson E (1992) *J Mol Evol* **34:** 493-505
33. Okimoto R, Macfarlaine JL, Clary DO, Wolstenholme DR (1992) *Genet* **130:** 471-498
34. Rippe RM, Gellissen G (1994) *Curr Genet* **25:** 135-141
35. Campbell NJ, Barker SC (1999) *Mol Biol Evol* **16:** 732-740
36. Boore JL, Brown WM (1994) *Genet* **138:** 423-443
37. Batuecas B, Garesse R, Calleja M, Valverde JR, Marco R (1988) *Nucl Acids Res* **16:** 6515-6529
38. Beagley CT, Okada NA, Wolstenholme DR (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 5619-5623
39. Koerber S, Santos AN, Teteus F, Kuchenhoff A, Fischer B (1998) *Mol Reprod Dev* **49:** 394-399
40. Iglesias T, Canbin J, Zaballos A, Bernal J, Munoz A (1995) *Biochem Biophys Res Com* **210:** 995-1000
41. Kodama S, Yamada H, Annab L, Barrett JC (1995) *Exp Cell Res* **219:** 82-96
42. Tourmente S, Savre-Train I, Berthier F, Renaud M (1990) *Cell Differ Dev* **31:** 137-149
43. Gibb GM, Ragan CI (1990) *J Biochem* **265:** 903-906
44. Yagi T (1993) *Biochem Mol Biol Int* **30:** 253-26
45. Bentlage HACM, Janssen AJM, Chomyn A, Attardi G, Walker JE, Schaegger H, Sengers RCA, Trijbels FJM (1995) *Biochim Biophys Acta* **1234:** 63-73
46. Ragan CI (1987) *Curr Top Bioenerg* **15:** 1-36
47. Sellem CH, d'Aubenton-Carafa Y, Rossignol M, Belcour L (1996) *Genet* **143:** 777-788
48. Hogue DL, Ellison MJ, Vickers M, Cass CE (1997) *Biochem Biophys Res Com* **238:** 811-816
49. Soole KL, Menz RI (1995) *J Bioenerg Biomembr* **27:** 397-406
50. Xue Y, Davies DR, Thomas CM (1990) *Mol Gen Genet* **221:** 195-198

51. Perotta G, Regina TMR, Ceci LR, Quagliariello C (1996) *Mol Gen Genet* **251:** 326-337
52. Rurek M, Oczkowski M, Augustyniak H (1998) *Acta Biochim Polon* **45:** 695-699
53. Kanazawa A, Tozuka A, Kato S, Nikami T, Abe J, Shimamoto Y (1998) *Curr Genet* **33:** 188-198
54. Jańska H, Wołoszyńska M (1997) *Acta Biochim Polon* **2:** 239-250
55. Morawala-Patell V, Gualberto JM, Lamattina L, Grienenberger JM, Bonnard G (1998) *Mol Gen Genet* **258:** 503-511
56. Haouazine N, Takvorian A, Jubier MF, Michel F, Lejeune B (1993) *Curr Genet* **24:** 533-588
57. Wissinger B, Brennicke A, Schuster W (1992) *Trends Genet* **8:** 322-340
58. Haouazine N. de Souza AP, Jubier MF, Lancelin D, Delcher E, Lejeune B (1992) *Plant Mol Biol* **20:** 395-404
59. Pla M, Mathieu C, De Paepe R, Chetrit P, Vedel F (1995) *Mol Gen Genet* **248:** 79-88
60. Gutierres S, Combettes B, De Paepe R, Mirande M, Lelandais C, Vedel F, Chetrit P (1999) *Eur J Biochem* **261:** 361-370
61. Duby F, Matague RF (1999) *Plant Cell* **11:** 115-126
62. Zardoya R, Meyer A (1996) *Mol Biol Evol* **13:** 933-942
63. Pesole G, Ceci LR, Gissi C, Saccone C, Quagliariello C (1996) *J Mol Evol* **43:** 447-452
64. Yang YW, Lai KN, Tai PY, Li WH (1999) *J Mol Evol* **48:** 596-604
65. Benne R (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6:** 221-231
66. Steinhauser S, Beckert S, Capesius I, Malek O, Knoop V (1999) *J Mol Evol* **48:** 303-312
67. Brennicke A, Marchfelder A, Binder S (1999) *FEMS Microbiol Rev* **23:** 297-316
68. Maier RM, Zeltz P, Koessel H, Bonnard G, Gualberto JM, Grienenberger JM (1996) *Plant Mol Biol* **32:** 343-365
69. Gray MW (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 8157-8159
70. Williams MA, Kutcher BM, Mulligan RM (1998) *Plant Mol Biol* **36:** 229-237
71. Kubo N, Kadowaki K (1997) *FEBS Lett* **413:** 40-44
72. Gualberto JM, Lamattina L, Bonnard G, Weil JH, Grienenberger JM (1989) *Nature(Lond)* **341:** 660-662
73. Hoch B, Maier RM, Appel K, Igloi GL, Koessel H (1991) *Nature(Lond)* **353:** 178-180
74. Karcher D, Bock R (1998) *Nucl Acids Res* **26:** 1185-1190
75. Howad W, Kempken F (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94:** 11090-11095
76. Malek O, Laettig K, Hiesel R, Brennicke A, Knoop V (1996) *EMBO J* **15:** 1403-1411
77. Shields DC, Wolfe KH (1997) *Mol Biol Evol* **14:** 344-349
78. Zanlugo S, Quinones V, Moenne A, Holuigue L, Jordana X (1995) *Curr Genet* **27:** 565-571
79. Lu B, Wilson RK, Phreaner CG, Mulligan RM, Hanson MR (1996) *Mol Cell Biol* **16:** 1543-1549
80. Mulligan RM, Williams MA, Shanahan MT (1999) *J Hered* **90:** 338-344
81. Yu W, Sanchez H, Schuster W (1998) *Methods* **15:** 63-74
82. Blanc V, Jordana V, Litvak S, Araya A (1996) *Biochim* **78:** 511-517
83. Faivre-Nitschke E, O'Brian C, Mulligan RM, Grienenberger JM, Gualberto JM (1998) W: Moller IM, Gardestroem P, Glimelius K, Glaser E (red) *Proceedings of the International Congress on Plant Mitochondria: From Gene To Function*, Backhuys Publishers, Leiden, str. 127-130
84. Feagin JE (1990) *J Biol Chem* **265:** 19373-19376
85. Sloof P, Benne P (1993) *FEBS Lett* **325:** 146-151
86. Van der Spek H, Speijer D, Arts GJ, Van den Burg J, Steeg H, Sloof P, Benne R (1990) *EMBO J* **9:** 257-262
87. Blom D, de Haan A, van den Berg M, Sloof P, Jirku M, Lukes J, Benne R (1998) *Nucl Acids Res* **26:** 1205-1213
88. Koslowsky DJ, Riley GR, Feagin JE, Stuart K (1992) *Mol Cell Biol* **12:** 2043-2049
89. Blum B, Simpson L (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89:** 11944-11948
90. Hermann T, Schmid B, Heumann N, Goringer HU (1997) *Nucl Acids Res* **25:** 2311-2318
91. Koslowsky DJ, Yahampath G (1997) *Mol Biochem Parasitol* **90:** 81-94
92. Borner GV, Morl M, Wissinger B, Brennicke A, Schmelzer C (1995) *Mol Gen Genet* **246:** 739-744
93. Sutton CA, Conklin PL, Pruitt KD, Hanson MR (1991) *Mol Cell Biol* **11:** 4274-4277
94. Chapdeleine Y, Bonen L (1991) *Cell* **65:** 465-472
95. Begu D, Marcado A, Farre JC, Moenne A, Holuigue L, Araya A, Jordana X (1998) *Curr Genet* **33:** 420-428
96. Binder S, Marchfelder A, Brennicke A, Wissinger B (1992) *J Biol Chem* **267:** 7615-7623
97. Lippok B, Brennicke A, Unseld M (1996) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377**: 251-257
98. Itani K, Handa H (1998) *Curr Genet* **34:** 318-325
99. Suzuki T, Kazama S, Hirai A, Akihama T, Kadowaki K (1991) *Curr Genet* **20:** 331-337
100. Karpińska B, Karpiński S, Haellgren JE (1995) *Curr Genet* **28:** 423-428
101. Rankin CT, Cutright MT, Makaroff CA (1996) *Curr Genet* **29:** 564-571
102. Schuster W, Wissinger B, Unseld M, Brennicke A (1990) *EMBO J* **9:** 263-269
103. Gualberto JM, Bonnard G, Lamattina L, Grienenberger JM (1991) *Plant Cell* **3:** 1109-1120
104. Grosskopf D, Mulligan RM (1996) *Curr Genet* **29:** 556-563
105. Wilson RK, Hanson MR (1996) *Curr Genet* **30:** 502-508
106. Lamattina L, Grienenberger JM (1991) *Nucl Acids Res* **19:** 3275-3282
107. Lamattina L, Weil JH, Grienenberger JM (1989) *FEBS Lett* **258:** 79-83
108. Geiss KT, Abbas GM, Makaroff CA (1994) *Mol Gen Genet* **243:** 97-105
109. Brandt P, Sunkel S, Unseld M, Brennicke A, Knoop V (1992) *Mol Gen Genet* **236:** 33-38
110. Knoop V, Schuster W, Wissinger B, Brennicke A (1991) *EMBO J* **10:** 3483-3493
111. Haouazine-Takvorian N, Takvorian A, Jubier MF, Lejeune B (1997) *Curr Genet* **31:** 63-69
112. Gaebler L, Herz U, Liddel A, Leaver CJ, Schroeder W, Brennicke A, Grohmann L (1994) *Mol Gen Genet* **244:** 33-40
113. Bonen L. Williams K, Bird S, Wood C (1994) *Mol Gen Genet* **244:** 81-89
114. Carillo C, Bonen L (1997) *Nucl Acids Res* **25:** 403-409
115. Lamattina L, Gonzales D, Gualberto J, Grienenberger JM (1993) *Eur J Biochem* **217:** 831-838
116. Grohmann L, Thieck O, Herz U, Schroeder W, Brennicke A (1994) *Nucl Acids Res* **22:** 3204-3311
117. Lu B, Hanson MR (1996) *Nucl Acids Res* **24:** 1369-1374
118. Nishiwaki S, Nakazono M, Tsutsumi N, Hirai A (1995) *Plant Cell Physiol* **36:** 1135-1138
119. Boer PH, Gray MW (1988) *EMBO J* **7:** 3501-3508
120. Wahleithner JA, Macfarlaine JL, Wolstenholme DR (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87:** 548-552
121. Wissinger B, Schuster W, Brennicke A (1991) *Cell* **65:** 473-482
122. Lelandais C, Gutierres S, Mathieu C, Vedel F, Remacle C, Marechal-Drouard L, Brennicke A, Binder S, Chetrit P (1996) *Nucl Acids Res* **24:** 4798-4804
123. Spassova M, Moneger F, Leaver CJ, Petrov P, Atanassov A, Nijkamp HJ, Hille J (1994) *Plant Mol Biol* **26:** 1819-1831

124. Conklin PL, Wilson RK, Hanson MR (1991) *Genes Dev* **5**: 1407-1415
125. Nozato N, Oda K, Yamato K, Ohta E, Takemura M, Akashi K, Fukuzawa H, Ohyama K (1993) *Mol Gen Genet* **237**: 343-350
126. Handa H, Mizobuchi-Fukuoka R, Pinyarat W (1997) *Curr Genet* **31**: 336-342
127. Lippok B, Brennicke A, Wissinger B (1994) *Mol Gen Genet* **243**: 39-46
128. Kim KS, Schuster W, Brennicke A, Choi KT (1991) *Plant Physiol* **97**: 1602-1603
129. Schuster W (1993) *Mol Gen Genet* **240**: 445-449
130. Nakazono M, Itadani H, Wakasugi T, Tsutsumi N, Sugiura M, Hirai A (1995) *Curr Genet* **33**: 188-198
131. Yamato K, Nozato N, Oda K, Ohta E, Takemura M, Akashi K, Ohyama K (1993) *Curr Genet* **23**: 526-531
132. Pratje E, Vahrenholz C, Buhler S, Michaelis G (1989) *Curr Genet* **16**: 61-64
133. Marienfeld JR, Newton KJ (1994) *Plant Physiol* **104**: 301-302
134. Itadani H, Wakasugi T, Sugita M, Sugiura M, Nakazono M, Hirai A (1994) *Plant Cell Physiol* **35**: 1239-1244
135. Wintz H, Chen HC, Pillay DTN (1989) *Curr Genet* **15**: 155-160
136. Leblanc C, Boyen C, Richard O, Bonnard G, Grienenberger JM, Kloareg B (1995) *J Mol Biol* **250**: 484-495
137. Wolff G, Plante I, Lang BF, Kuck U, Burger G (1994) *J Mol Biol* **237**: 75-86
138. Kroymann J, Zetsche K (1998) *J Mol Evol* **47**: 431-440
139. Malek O, Knoop V (1998) *RNA* **4**: 1599-1609
140. Knoop V, Brennicke A (1991) *Curr Genet* **20**: 423-425
141. Ecke W, Schmitz U, Michaelis G (1990) *Curr Genet* **18**: 133-139
142. Wissinger B, Hiesel R, Schuster W, Brennicke A (1988) *Mol Gen Genet* **212**: 56-65
143. Kato S, Shimamoto Y, Mikami T (1995) *Physiol Plant* **93**: 572-575
144. Pereira de Souza A, Jubier MF, Lejeune B (1992) *Curr Genet* **22**: 75-82
145. Chetrit P, Rios R, De Paepe R, Vitart V, Gutierres S, Vedel F (1992) *Curr Genet* **21**: 131-137
146. Pereira de Souza A, Jubier MF, Delcher E, Lancelin D, Lejeune B (1991) *Plant Cell* **3**: 1363-1378
147. L'Homme Y, Stahl RJ, Li QX, Hameed A, Brown GG (1997) *Curr Genet* **31**: 325-335
148. Nugent JM, Palmer JD (1993) *Curr Genet* **23**:148-153
149. Nakazono M, Ito Y, Tsutsumi N, Hirai A (1996) *Curr Genet* **29**: 412-416
150. Kubo T, Mikami T, Kinoshita T (1993) *Mol Gen Genet* **241**: 479-482
151. Brennicke A, Klein M, Binder S, Knoop V, Grohmann L, Malek O, Marchfelder A, Marienfeld J, Unseld M (1996) *Naturwissenschaften* **83**: 339-346
152. Ohyama K (1996) *Biosci Biotech Biochem* **60**: 16-24

Antyportery Na^+/H^+ w komórkach ssaczych

Mammalian Na^+/H^+ exchangers

ANNA KICIŃSKA*

Spis treści:

Contents:

Wykaz skrótów: CaM — kalmodulina; CHP- (ang. calcineurin B *homolog protein*) białko homologiczne z kalcyneuryną B; ER-retikulum endoplazmatyczne; FGF — fibroblastowy czynnik wzrostu; $[H^+]_w$- wewnątrzkomórkowe stężenie H^+; $[H^+]_z$- zewnątrzkomórkowe stężenie H^+; HOE694- (3-metylosulfonylo, 4-piperydynobenzoilo) metasulfonian guanidyny; IP_3R- receptor IP_3; K_D- stała dysocjacji; MAPK — (ang. *mitogen activated protein kinase*) kinaza aktywowana przez mitogen; MEK- (ang. *mitogen/extracellular signaling kinase*) kinaza kinazy MAP-Erk; $[Na^+]_w$- wewnątrzkomórkowe stężenie Na^+; $[Na^+]_z$ — zewnątrzkomórkowe stężenie Na^+; NHE — antyporter Na^+/H^+; NHERF- (ang. Na^+/H^+ *exchanger regulatory factor*) białko regulujące aktywność antyportera NHE3; PKA — białkowa kinaza A; pH_i — wewnątrzkomórkowe pH; PKC — białkowa kinaza C; PTH — parathormon; pz — par zasad; SH3 — region 3 homologii src.

I. Wstęp

Antyportery Na^+/H^+ (NHE — ang. *sodium/proton exchangers*) usuwają z wnętrza komórki jony H^+ z jednoczesnym pobieraniem jonów Na^+. Wymiana Na^+/H^+ chroni komórki przed niebezpiecznym zakwaszeniem środowiska wewnątrzkomórkowego. Z drugiej strony, zmiany wewnątrzkomórkowego pH często zapoczątkowują zmiany związane z etapem rozwoju, na którym znajduje się komórka czy jej stanem funkcjonalnym. Procesy te mogą więc być regulowane poprzez zmiany aktywności antyporterów Na^+/H^+. Wymiana Na^+/H^+ jest również bardzo istotna dla regulacji objętości komórki oraz resorpcji jonów Na^+ w komórkach nabłonkowych układu pokarmowego i nerek. Antyport Na^+/H^+ najprawdopodobniej gra również kluczową rolę w uszkodzeniach ludzkiego mięśnia sercowego podczas ischemii i reperfuzji [1].

Aktywność antyportu Na^+/H^+ została zaobserwowana we wszystkich dotychczas przebadanych komórkach eukariotycznych (komórki grzybów [2], zwierząt [3-7] i roślin [8, 9]), jak również w komór-

*Mgr, Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, e-mail anias@nencki.gov.pl

kach prokariotycznych [10]. Eukariotyczne antyportery Na^+/H^+ wykazują jednak niewielkie podobieństwo do bakteryjnych białek NhaA i NhaB opisanych u *Escherichia coli* [11]

Ponieważ białka NHE biorą udział w tak wielu podstawowych dla funkcjonowania organizmu procesach, ich aktywność jest bardzo ściśle regulowana przez różne czynniki, takie jak: hormony, czynniki wzrostu, jony wapniowe oraz czynniki fizyczne takie jak zmiany objętości komórki [12]. W spolaryzowanych komórkach nabłonkowych aktywność antyportu Na^+/H^+ obserwuje się zarówno w błonach bazolateralnych jak i apikalnych. Białka NHE występujące w każdej z nich pełnią odmienne funkcje i wykazują charakterystyczne właściwości zarówno kinetyczne, biochemiczne jak i farmakologiczne.

Do tej pory udało się scharakteryzować i poznać sekwencję aminokwasową sześciu białek z rodziny NHE (oznaczonych skrótem NHE oraz liczbą od 1 do 6), z których pięć (NHE1 — 5) katalizuje transport kationów w błonach plazmatycznych komórek różnych typów, a jedno jest białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej (NHE6).

II. Ogólna charakterystyka antyporterów Na^+/H^+

II-1. Rodzina genów kodujących antyportery Na^+/H^+ (NHE)

Poszczególne izoformy antyporterów Na^+/H^+ (NHE1-6) kodowane są przez osobne geny, położone w różnych rejonach genomów ssaków [13-17]. Nie występują przypadki alternatywnego składania (ang. *splicing*) pojedynczych transkryptów mRNA [3]. Jedynie w przypadku szczurzego białka NHE2 wyizolowano alternatywne mRNA, kodujące białko pozbawione 116 N-końcowych aminokwasów [18].

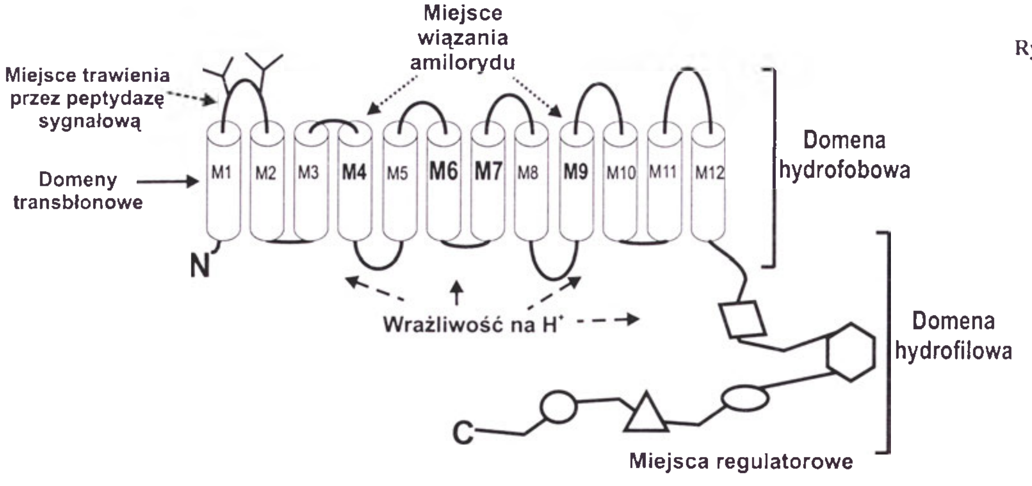
Białka NHE1- 5 wykazują dość znaczne podobieństwo pod względem sekwencji aminokwasowej (~34 — 60% identycznych aminokwasów), a ich przewidywana masa cząsteczkowa wynosi od 81 do 93 kDa [3].

Izoforma NHE6 będąca białkiem mitochondrialnym wykazuje znacznie niższą homologię sekwencji do pozostałych białek tej rodziny (~20%) z tym, że podobieństwo zostaje zachowane w największym stopniu w obrębie domen transbłonowych odpowiedzialnych za transport jonów [19]. Gen *NHE6* zawiera otwartą ramkę odczytu o długości 2010 pz., a przewidywana masa cząsteczkowa białka wynosi 74 kDa [19].

II-2. Struktura antyporterów Na^+/H^+ oraz ich lokalizacja

Opierając się o badania hydrofobowości antyporterów Na^+/H^+ wykazano, że ich cząsteczki są podobnie zbudowane. Składają się mianowicie z dwóch funkcjonalnych domen, hydrofobowej zawierającej kilka transbłonowych sekwencji oraz hydrofilowej odpowiadającej za regulację ich aktywności transportowej (Ryc. 1). Część N-końcowa białek NHE składa się z 10 do 12 domen transbłonowych (M1-M12 Ryc. 1) i katalizuje wrażliwą na amiloryd wymianę Na^+/H^+ [20]. Pozostałą część białek NHE stanowi stosunkowo długa (ok. 300 aminokwasów) [21], zlokalizowana w cytoplazmie komórki (lub w matriks mitochondrialnej w przypadku NHE6) domena C-końcowa. Domena C-końcowa mitochondrialnego białka NHE jest krótsza i składa się z około 170 aminokwasów [19].

Domeny C-koncowe poszczególnych białek NHE są do siebie podobne w znacznie mniejszym stopniu niż części hydrofobowe, zawierają bowiem od ~24 do 56% identycznych aminokwasów. Wcześniejsze



Ryc. 1. Schemat budowy strukturalnej antyporterów Na^+/H^+. Domena hydrofobowa składająca się z domen transbłonowych M1 — M12 oraz domena hydrofilowa z licznymi miejscami regulatorowymi. M6 i M7- najbardziej konserwatywny fragment sekwencji antyporterów Na^+/H^+, związany z transportem jonów, M4 i M9 — domeny prawdopodobnie odpowiedzialne za hamowanie antyporterów przez amiloryd.

badania wskazywały, iż domeny te są zlokalizowane w cytoplazmie komórek [3]. Ostatnio jednak wykazano, że część domeny C-końcowej białka NHE3 jest obecna na zewnątrz komórki [22]. Już wstępne doświadczenia pokazywały, że domena C-końcowa antyporterów Na^+/H^+ odpowiada za regulację ich aktywności transportowej poprzez oddziaływanie z domeną transbłonową. Usunięcie cytoplazmatycznej części białka powoduje zanik ich wrażliwości na stymulację hormonalną oraz zmienia wrażliwość białek NHE na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów H^+ [20]. C-końcowe fragmenty białek NHE zawierają liczne miejsca potencjalnej fosforylacji oraz sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie antyporterów z białkami regulującymi ich aktywność [23]. Domena C-końcowa białka NHE2 zawiera dwa regiony (Pro-1 i Pro-2) szczególnie bogate w prolinę, podobne do domen homologii 3 src (SH3 — ang. src-*homology*-3 *binding domains*) [24]. Rejon Pro-1 wiąże *in vitro* domeny SH3 różnych białek, natomiast Pro-2 oddziałuje raczej z domenami kinaz białkowych. Następnie wykazano, że region Pro-1 jest niezbędny, aby antyporter NHE2 był zlokalizowany w błonie apikalnej komórek nabłonkowych. W komórkach, w których zachodzi ekspresja białek NHE2 niezawierających domeny Pro-1, antyportery występują w błonie komórkowej po stronie bazolateralnej oraz w cytoplazmie komórek [24].

cDNA izoform NHE z błony plazmatycznej zawiera sekwencję kodującą, tzw. peptyd sygnałowy, składający się z aminokwasów hydrofobowych i hydrofilowych, zawierający miejsce potencjalnego trawienia przez peptydazę sygnałową (Ryc. 1) [25]. Nie jest jeszcze jasne, czy peptyd sygnałowy jest usuwany podczas procesu dojrzewania białek NHE, czy może stanowi integralną część dojrzałego antyportera, zakotwiczającą białko w błonie plazmatycznej.

Z kolei, na N-końcu sekwencji białka NHE6, przy pomocy programu PSORT [26], znaleziono sekwencję kierującą to białko do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Mitochondrialna lokalizacja NHE6 została również potwierdzona w komórkach transfekowanych białkiem fuzyjnym składającym się z białka NHE6 oraz fluoryzującego białka GFP (ang. *green fluorescent protein*) [19]. Znajdujące się w N-końcowej części antyporterów Na^+/H^+ transbłonowe helisy M6 i M7 (Ryc. 1) stanowią rejon najbardziej konserwatywny poszczególnych izoform NHE (do 95% identycznych aminokwasów), co sugeruje, że jest to rejon bezpośrednio zaangażowany w transport jonów. Fafournoux i wsp. [27] wykazali, że w NHE1 zastąpienie glutaminianu 262 w domenie M7 przez izoleucynę (Glu262Ile) prowadzi do całkowitego zahamowania transportu jonów przez ten antyporter (mierzono pobieranie jonów $^{22}Na^+$) [27].

Antyportery Na^+/H^+ najprawdopodobniej występują w błonach plazmatycznych w postaci homodimerów [27, 28]. Dokładne miejsca oddziaływania monomerów nie zostały jednak jeszcze zidentyfikowane. Wiadomo, że istotną, dla tego oddziaływania, rolę gra rejon transbłonowy białek NHE oraz prawdopodobnie powstające pomiędzy monomerami wiązania dwusiarczkowe [28].

W sekwencji antyporterów Na^+/H^+ znaleziono kilka miejsc potencjalnej glikozylacji. Białko NHE1 zawiera aminokwasy zarówno N- (Asn75) jak i O-glikozylowane [21, 24]. Z kolei NHE2 pochodzące z tkanek królika ulega wyłącznie O-glikozylacji [16], a NHE3 prawdopodobnie nie jest wcale glikozylowane [29]. Usunięcie podjednostek węglowodanowych z białek NHE1 i NHE2 nie powodowało jednak widocznych zmian w szybkości transportu jonów ani przez błony pęcherzyków lipidowych, ani w transfekowanych komórkach [16, 25, 30]. Również w części N-końcowej białka NHE6 znaleziono miejsce mogące ulec N-glikozylacji (Asn^{369}) [19].

mRNA izoformy NHE1 ulega ekspresji praktycznie we wszystkich tkankach (Tabela 1) i komórkach ssaczych. Prawdopodobnie białko to pełni funkcje w tak podstawowych procesach jak utrzymywanie i regulacja wewnątrzkomórkowego pH oraz regulacja objętości komórki [3]. Wykazano, że promotor genu *NHE1* jest aktywowany *in vitro* pod wpływem wielu czynników mitogennych, a więc że aktywność NHE1 może być regulowana w procesach wzrostu i różni-

Tabela 1

Lokalizacja tkankowa poszczególnych izoform antyporterów Na^+/H^+

Izoforma	Lokalizacja tkankowa	Bibliografia
NHE1	Wszystkie przebadane rodzaje komórek i tkanek, błony bazolateralne i apikalne	[3]
NHE2	Nabłonki kanalików nerkowych, jelita i żołądka, błony bazolateralne i apikalne	[14], [15], [31]
NHE3	Nabłonki jelita, nerek (kanaliki proksymalne), i żołądka, błony apikalne	[14], [29], [31]
NHE4	Żołądek, jelito >nerki, mózg, macica, mięśnie szkieletowe	[14]
NHE5	Mózg, śledziona, jądra	[32], [33]
NHE6	Mózg, mięśnie szkieletowe, serce	[19]

cowania się komórek poprzez wzrost poziomu ekspresji białka [34].

Izoformy NHE2, 3 i 4 charakterystyczne są dla komórek nabłonkowych, głównie układu pokarmowego i nerek [2, 14, 15]. Wykazano, że izoforma NHE2 w komórkach nabłonkowych jest odpowiedzialna za utrzymywanie i regulację wewnątrzkomórkowego pH oraz regulację objętości komórki [35]. Stwierdzono, że stres osmotyczny może regulować poziom ekspresji NHE2 w kanalikach zbiorczych nerek [36]. Ostatnio zidentyfikowano w obrębie promotora genu *NHE2* dwie sekwencje odpowiedzialne za tę regulację [37]. Białko NHE3 ulega ekspresji w komórkach nabłonka jelita oraz kanalików proksymalnych nerek, zawsze po stronie apikalnej [29, 38]. Prawdopodobnie NHE3 uczestniczy w absorpcji jonów Na^+ w tych komórkach.

Izoforma NHE4 w największych ilościach jest syntetyzowana w komórkach nabłonka żołądka oraz kanalików zbiorczych nerek, prawdopodobnie pozwalając na zachowanie stałej objętości komórkom narażonym na stały kontakt ze stężonymi roztworami [14, 39].

Ekspresję białka NHE5 obserwuje się w komórkach mózgu, śledziony, jąder i mięśni szkieletowych [17]. Najprawdopodobniej, to właśnie NHE5 jest niewrażliwym na amiloryd antyporterem Na^+/H^+, którego aktywność obserwowano w neuronach hippokampa [40].

Mitochondrialny antyporter Na^+/H^+ (białko NHE6) ulega ekspresji we wszystkich badanych tkankach z tym, że ilość mRNA jest najwyższa w tkankach szczególnie bogatych w mitochondria, takich jak mózg, mięśnie szkieletowe i serce [19].

Badania z zastosowaniem przeciwciał oraz frakcjonowania komórek wykazały, że antyportery Na^+/H^+ nie są równomiernie zlokalizowane w błonie plazmatycznej komórek. Np. białko NHE1 gromadzi się w okolicy lamellipodiów w fibroblastach rosnących w monowarstwie, w miejscach, w których dochodzi do asocjacji takich białek jak winkulina, talina i F-aktyna [41]. Obserwacje te zdają się wskazywać, że białko NHE1 może oddziaływać ze szkieletem komórkowym. Ostatnio wykazano, że cytoszkielet aktynowy jest czynnikiem wpływającym na rozmieszczenie białka NHE3 w błonie plazmatycznej [42]. Substancje powodujące depolimeryzację F-aktyny w dużym stopniu hamowały aktywność NHE3 oraz powodowały jego akumulację w miejscach agregacji aktyny [42].

Na podstawie wyników badań funkcjonalnych przypuszczano, że antyportery Na^+/H^+ są obecne, poza błoną plazmatyczną, również w innych przedziałach komórkowych [43, 44]. Wiadomo na przykład, że izoforma NHE3 jest obecna w endosomach (ang. *recycling endosomes*). [45]. Najnowsze badania wykazały również, że internalizacja białka NHE3 zachodzi przy udziale pęcherzyków klatrynowych [24]. Regulacja aktywności NHE3 przez parathormon (PTH) zależy od zmian rozmieszczenia białek antyportera [46]. I tak, pod wpływem parathormonu gwałtownie spada aktywność NHE3 w kanalikach proksymalnych nerek szczura, co jest związane ze spadkiem ilości białka w błonach apikalnych komórek, a nie całkowitej ilości NHE3 w tych komórkach. Również antyporter Na^+/H^+ z drożdży, zwany Nhx1, występuje w pęcherzykach prewakuolarnych, odpowiadających późnym endosomom w komórkach zwierzęcych. [47].

Występowanie na N-końcu białka NHE6 sekwencji kierującej do mitochondriów wskazuje, że białko NHE6 może być antyporterem wewnętrznej błony mitochondrialnej [19]. Obserwacje pokazujące, że ekspresja tego antyportera zachodzi we wszystkich przebadanych tkankach oraz, że jej poziom jest szczególnie wysoki w tkankach bogatych w mitochondria, potwierdzają te przypuszczenia [19]. Dodatkowo pokazano, że sygnał lokalizacji mitochondrialnej na N-końcu białka NHE6 wystarcza, aby białka fuzyjne NHE6-GFP były transportowane do mitochondriów transfekowanych komórek. Antyporter NHE6 usuwa jony Na^+ z matriks mitochondrialnej, co ma prawdopodobnie ogromne znaczenie dla regulacji stężenia jonów Ca^{2+} w mitochondriach (por. Rozdz. IV-2) [48].

II-3. Podstawowe właściwości biochemiczne i farmakologiczne antyporterów Na^+/H^+

Zależność szybkości transportu Na^+ i H^+ przez białka NHE od zewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ spełnia równanie Michaelisa-Menten. Obserwacja ta sugeruje obecność jednego miejsca wiązania jonów Na^+ w białkach NHE [49]. Podobną zależność obserwuje się również w przypadku białka NHE6 z mitochondriów [50]. Zależność szybkości transportu od stężenia jonów Na^+ izoformy NHE4 ilustruje krzywa sigmoidalna [51]. Stała Michaelisa-Menten K_m dla poszczególnych izoform wynosi 5-50 mM [52, 53]. Inne kationy jednowartościowe także wpływają na aktywność białek NHE. Li^+ i H^+ podane zewnątrzkomórkowo kompetencyjnie hamują pobieranie Na^+ [54].

Jedną z podstawowych cech antyporterów Na^+/H^+ jest ich wrażliwość na wewnątrzkomórkowe stężenie H^+. Protony są allosterycznymi aktywatorami białek

NHE. Aktywność antyporterów gwałtownie rośnie, gdy wartość wewnątrzkomórkowego pH spadnie poniżej określonego poziomu progowego, powodując usuwania nadmiaru jonów H^+ z wnętrza komórki [55]. Cecha ta jest wspólna dla wszystkich dotychczas zbadanych izoform (NHE1-3) z tym, że wartość stężenia progowego jest charakterystyczna dla poszczególnych antyporterów [49]. Badanie wykorzystujące syntezę zmutowanych antyporterów wykazały, że rejon N-końcowy białek NHE jest odpowiedzialny za ich wrażliwość na stężenie jonów H^+, podczas gdy domeny odpowiedzialne za wartość stężenia progowego znajdują się w cytoplazmatycznej części białek (Ryc. 1 i 2) [20].

Zarówno dane kinetyczne, jak i termodynamiczne (przy stężeniach jonów $[Na^+]_z/[Na^+]_w = [H^+]_z/[H^+]_w$ przepływ jonów przez antyport jest niezauważalny [56]) wskazują, że antyportery Na^+/H^+ transportują jony w sposób elektroneutralny (stechiometria 1:1) [56]. Reakcja transportu jonów jest odwracalna i zależy od chemicznego gradientu Na^+ i H^+ w poprzek błony, nie wymagając bezpośredniego wkładu energii np. pochodzącej z hydrolizy ATP.

Aktywność antyporterów Na^+/H^+ jest hamowana przez moczopędny lek, amiloryd oraz jego pochodne [57], a także przez związki benzoiloguanidynowe (np. HOE694) [58, 59]. Aktywność poszczególnych izoform w różnym stopniu jest hamowana przez te związki, najbardziej wrażliwa jest izoforma NHE1, a następnie NHE2, NHE3 i NHE4 [51, 58, 60, 61]. Z kolei izoforma mitochondrialna, NHE6 jest praktycznie niewrażliwa na amiloryd, natomiast jego analog — benzamil hamuje NHE6 [50, 52, 62]. Inne substancje zawierające grupy imidazolinowe lub guanidynowe, a więc strukturalnie podobne do amilorydu lub HOE694, takie jak cimetydyna, klonidyna i harmalina również w różnym stopniu hamują aktywność białek NHE [60].

Hamowanie aktywności antyporterów Na^+/H^+ przez amiloryd i inne wyżej wymienione związki jest częściowo odwracalne w przypadku dużego zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Na^+. W związku z tym do niedawna uważano, że miejsca wiązania inhibitorów są położone w bezpośrednim sąsiedztwie domeny odpowiedzialnej za transport jonów. Wykazano jednak, że aminokwasy w domenach transbłonowych M4 i M9 odpowiedzialne są za wrażliwość białek NHE na amiloryd i jego pochodne [63] oraz, że nie jest to rejon bezpośrednio związany z transportem jonów (Ryc. 1).

Wydaje się, że ATP jest również niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania antyporterów Na^+/H^+. Obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP drastycznie obniża aktywność NHE zarówno w systemach natywnych jak i w transfekowanych komórkach [3, 35, 64]. Wydaje się, że podłożem tych zmian jest zmiana wrażliwości antyportera na stężenie jonów H^+ [3]. Początkowo przypuszczano, że efekt ATP wiąże się ze stanem fosforylacji białek NHE. Jednak, ponieważ brak ATP hamuje również aktywność cząsteczek NHE pozbawionych wszystkich miejsc potencjalnej fosforylacji, przypuszcza się, że hamujący efekt ATP nie jest bezpośredni [65]. Prawdopodobnie istnieją dodatkowe białka wiążące się z białkami NHE, których wpływ na aktywność transporterów zależy od poziomu fosforylacji.

III. Regulacja aktywności antyporterów Na^+/H^+

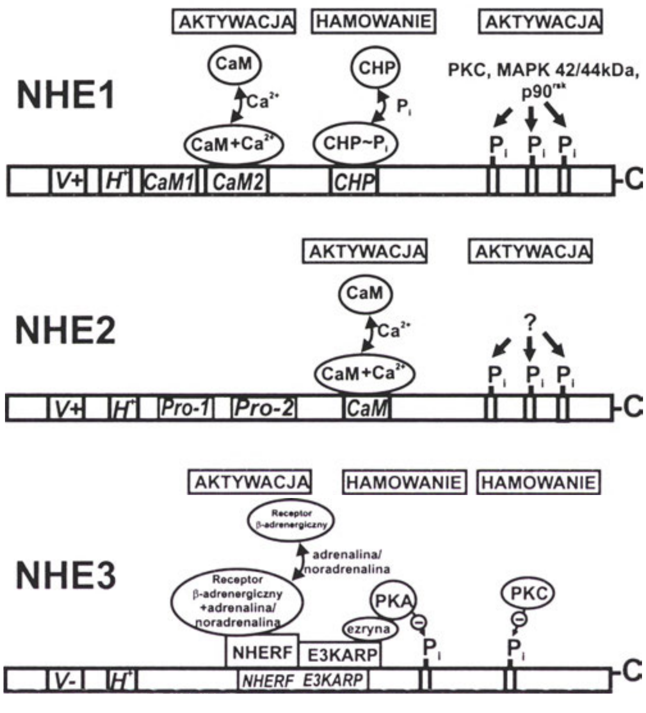
Aktywność białek NHE zmienia się pod wpływem wielu czynników, takich jak hormony, czynniki wzrostowe, zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wodorowych i wapniowych oraz zmiany objętości komórki [23]. Regulacja ta zachodzi poprzez bezpośrednie zmiany poziomu fosforylacji antyporterów Na^+/H^+ lub poprzez oddziaływanie antyporterów ze specyficznymi białkami regulatorowymi (Ryc. 2). W przypadku powszechnie występującej izoformy NHE1 czynniki zewnątrzkomórkowe najprawdopodobniej zwiększają powinowactwo tego białka do wewnątrzkomórkowych jonów H^+ [66]. Regulacja aktywności pełniących odmienne funkcje izoform epitelialnych (NHE2 i NHE3) zachodzi poprzez zmiany szybkości maksymalnej transportu (V_{max}) [49].

III-1. Fosforylacja

Białka NHE z błon plazmatycznych zawierają liczne miejsca potencjalnej fosforylacji przez białkowe kinazy A i C, kinazę kalmoduliny oraz kinazy Ser/Thr [4]. Również białko NHE6 zawiera wiele miejsc potencjalnej fosforylacji przez kinazy białkowe zależne od cyklicznych nukleotydów oraz kinazę kazeiny II [19].

Eksperymentalnie dowiedziono, że białko NHE1 jest fosforylowane w komórce spoczynkowej w mniejszym stopniu niż w komórce funkcjonalnie zmienionej po podaniu takich substancji jak czynniki wzrostowe, estry forbolu czy inhibitory fosfataz [3]. Ponieważ wiele z tych czynników wywiera wpływ na komórki docelowe poprzez aktywację kinaz białkowych, początkowo uważano, że białka NHE są bezpośrednio fosforylowane i w ten sposób regulowana jest ich aktywność. Okazało się jednak, iż większość

substancji regulujących zachowuje zdolność do regulacji aktywności zmutowanych białek NHE pozbawionych miejsc fosforylacji, a część wcale nie zmienia stopnia ufosforylowania białek NHE [3]. Wykazano także, że kinazy MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) 44kDa oraz $p90^{rsk}$ (Ser^{703}) fosforylują rejon obejmujący 178 C-końcowych aminokwasów NHE1 jednocześnie regulując aktywność białka [67, 68]. Kinaza $p90^{rsk}$ najprawdopodobniej bierze udział w regulacji aktywności białka NHE1 poprzez endotelinę I w miocytach z serca szczura [67]. Również aktywacja antyportera NHE1 związana z aktywacją receptora kannabinoidowego przebiega prawdopodobnie z udziałem kinaz MAPK p42/44 [69].



Ryc. 2. Schemat przedstawiający miejsca regulatorowe w domenach hydrofilowych białek NHE 1, 2, 3 oraz białka wpływające na aktywność antyporterów. *V*-domena odpowiadająca za wrażliwość białek NHE na zmiany objętości komórki (*V*+: aktywacja, *V*-: hamowanie); H^+-domena określająca progowe stężenie H^+, które powoduje aktywację antyportera; *CaM (1, 2) CHP, E3KARP, NHERF* — miejsca wiązania białek regulatorowych, odpowiednio kalmoduliny (CaM), CHP, E3KARP i NHERF; *Pro-1 i Pro-2* — regiony bogate w prolinę; P_i - miejsca fosforylacji; PKA-kinaza białkowa A; PKC-kinaza białkowa C; MAPK 42/44kDa, $p90^{rsk}$- kinazy MAP.

Także domena C-końcowa białka NHE2 zawiera sekwencje odpowiedzialne za wrażliwość tego białka na czynniki wzrostu/kinazy białkowe [70]. Izoforma ta jest aktywowana m.in. przez surowicę, FGF, inhibitory fosfataz i estry forbolu [70]. Cząsteczka NHE2 zawiera prawdopodobnie kilka subdomen regulatorowych. Np. aminokwasy 540-573 są odpowiedzialne za wrażliwość NHE2 na inhibitory fosfataz, rejon 499-540 związany jest z regulacją prze FGF. W tej chwili nie wiadomo, czy wpływ tych substancji na antyporter NHE2 ma związek ze zmianami w poziomie fosforylacji NHE2, czy raczej jest związany z fosforylacją dodatkowych białek regulatorowych [70].

Izoforma NHE3 jest regulowana przez wiele czynników powodujących powstanie wtórnych przekaźników aktywujących białkową kinazę C [71]. Wykazano, że białko NHE3 jest bezpośrednio fosforylowane przez PKC [72]. Do zwiększenia poziomu fosforylacji oraz znacznego zahamowania aktywności białka NHE3 dochodzi także pod wpływem zwiększonego stężenia cAMP w komórce [3].

III-2. Oddziaływanie z innymi białkami

Domena cytosolowa białka NHE1 zawiera dwie domeny wiążące kalmodulinę z wysokim (K_D~20 nM) i niskim powinowactwem (K_D~350nM) [73]. Delecja pierwszego z tych rejonów (aminokwasy 636-656) powoduje konstytutywną aktywację antyportera, podobną do obserwowanej, kiedy stężenie Ca^{2+} w komórce jest stale podniesione. Sugeruje się więc, że przy normalnym stężeniu Ca^{2+} przy braku wiązania kalmoduliny przez antyporter jego aktywność zmniejsza się, podczas gdy przyłączenie kalmoduliny do NHE1 pod wpływem wzrostu stężenia Ca^{2+} w komórce prowadzi do aktywacji transportera (Ryc. 2). Także aktywność izoformy NHE2 jest regulowana przez kalmodulinę. Prawdopodobnie w obecności podwyższonego stężenia jonów Ca^{2+} w komórce dochodzi do związania się kalmoduliny z antyporterem NHE2 oraz do zwiększenia jego aktywności poprzez zwiększenie zarówno szybkości maksymalnej transportu V_{max}, jak i powinowactwa antyportera dla jonów H^+ [70]. Wykazano również, że wprowadzenie domeny wiążącej kalmodulinę 636-656 białka NHE1 do części cytosolowej białka NHE3 powoduje powstanie wrażliwości na stężenie jonów Ca^{2+} w tym białku [74].

Również białko homologiczne z kalcyneuryną B (ang. CHP — *calcineurin B homolog protein*) oddziałuje z fragmentem C-końcowym antyportera NHE1 [75]. Związanie ufosforylowanego białka CHP z antyporterem powoduje jego inaktywację. Z kolei defosforylacja CHP prowadzi do jego oddysocjowania oraz do aktywacji NHE1 [75].

Wykazano również wiązanie białka opiekuńczego hsp70 z antyporterem NHE1 [76]. Możliwe, że od-

działywania to ma miejsce jedynie podczas biosyntezy NHE1. Jednak, ponieważ wiązanie to jest odwracane przez MgATP, być może bierze ono udział w regulacji NHE1 przez ATP.

Aktywność antyportera NHE3 znacznie spada pod wpływem aktywacji kinazy białkowej zależnej od cAMP [77, 78]. Efekt ten być może zależy od obecności dwóch strukturalnie podobnych białek, zwanych NHERF i E3KARP, które mogą wiązać się z fragmentem domeny C-końcowej NHE3 [79]. Okazało się również, że dla obniżenia aktywności białka NHE3 w tych warunkach jednocześnie konieczna jest bezpośrednia fosforylacja Ser^{605} oraz obecność Ser^{634} w domenie C-końcowej NHE3 [80]. Ponieważ oba te aminokwasy znajdują się w rejonie, w którym prawdopodobnie dochodzi do interakcji pomiędzy białkami NHERF i E3KARP a NHE3, można przypuszczać, że Ser^{634} jest konieczna dla tego oddziaływania. Dodatkowo wykazano, że zarówno NHERF, jak i E3KARP wiążą ezrynę — białko będące składnikiem szkieletu komórkowego, które zakotwicza PKA w błonie komórkowej [81]. Być może białka NHERF i E3KARP powodują zbliżenia PKA do domeny C-końcowej NHE3, która następnie ulega fosforylacji w efekcie zwiększonego stężenia cAMP w komórce.

Opisano także oddziaływanie pomiędzy białkiem NHERF a receptorem β-adrenergicznym zależne od związania adrenaliny lub noradrenaliny z receptorem [82]. NHERF wiąże się z kilkoma ostatnimi aminokwasami receptora. Zastąpienie ostatniego aminokwasu receptora leucyny alaniną powoduje znaczne osłabienie tego oddziaływania oraz zaburza regulację NHE3 przez receptor β, jednocześnie nie wpływając na aktywność cyklazy adenylowej [82]. Jest to bardzo ciekawy przykład innego niż klasyczny (poprzez aktywację białek G i cyklazy adenylowej) wpływu pobudzenia receptora z β-adrenergicznego na metabolizm komórki. Obserwacje te mogą tłumaczyć fakt, że w przypadku aktywacji receptora β-adrenergicznego i bezpośredniej aktywacji PKA obserwuje się przeciwstawne efekty odpowiednio aktywację [83] i hamowanie aktywności NHE3 [84].

Także białka G biorą prawdopodobnie udział w regulacji transportu jonów przez białka NHE. Pod wpływem białek Ha-Ras i Gα13 wzrasta aktywność antyporterów NHE [85, 86]. Prawdopodobnie mechanizm tej aktywacji prowadzi poprzez kaskadę sygnałów związaną z kinazami MAPK 42/44kDa oraz kinazą MEK (ang. *mitogen/extracellular signaling kinase*) [87, 88].

W komórkach, które znajdują się w środowisku hiperosmotycznym dochodzi do aktywacji antyporterów NHE1, NHE2 i NHE4 [35]. Zjawisko to nie jest jednak związane ze zmianami poziomu fosforylacji białka, ani z gwałtownymi zmianami stężenia jonów Ca^{2+} [3]. Prawdopodobnie oddziaływanie białka NHE1 z nieznanymi białkami regulatorowymi jest odpowiedzialne za wrażliwość tego antyportera na zmiany objętości komórki.

Aktywność białka NHE1 wzrasta również w komórkach hodowanych na szalkach pokrywanych fibronektyną [89]. Jest możliwe, że na obserwowany wzrost aktywności NHE1 wpływ wywiera oddziaływanie fibronektyny z integrynami [90]. Integryny kotwiczą mikrofilamenty aktynowe do błony plazmatycznej poprzez oddziaływanie z taliną i α-aktyną oraz białkami szkieletu komórkowego. W tym świetle interesujące jest, że NHE1 może zostać wyizolowany wspólnie z F-aktyną, winkuliną i taliną [41].

IV. Funkcja antyporterów Na+/H+

IV-1. Antyportery Na+/H+ błony cytoplazmatycznej

IV-1.1. Regulacja wewnątrzkomórkowego pH

Jony wodorowe są aktywnie usuwane z komórek zwierzęcych zapewniając zachowanie fizjologicznej wartości wewnątrzkomórkowego pH. Transport jonów przez antyportery Na^+/H^+ stanowi jeden z głównych mechanizmów usuwania jonów H^+ z wnętrza komórek. W komórkach nieepitelialnych aktywność transporterów Na^+/H^+ jest bardzo niska w fizjologicznym pH, jednak gwałtownie wzrasta po zakwaszeniu cytosolu. Oczywiście, jak już wcześniej opisano (Rozdz. II-3. i III.), wrażliwość na stężenie jonów H^+ może być modyfikowana poprzez np. niskie stężenie ATP w komórce, czynniki wzrostowe czy stres osmotyczny. Wydaje się, że regulacja aktywności antyportera NHE1 przez pH_i jest jednym z czynników prowadzących do powstania niekorzystnych zmian w mięśniu sercowym podczas niedokrwienia i reperfuzji [91]. Podczas niedokrwienia dochodzi do znacznego obniżenia pH cytoplazmy, aktywacji antyportera i wzrostu stężenia Na^+. Przy jednoczesnym niskim poziomie ATP w komórkach serca, czyli zahamowaniu ATPazy Na^+/K^+ , jony Na^+ są usuwane przez antyporter Na^+/Ca^{2+}. W czasie niedokrwienia i późniejszej reperfuzji gwałtownie wzrasta stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie miocytów, co prowadzi

do arytmii, uszkodzeń mięśnia sercowego i nekrozy komórek [92].

IV-1.2. Regulacja objętości komórki

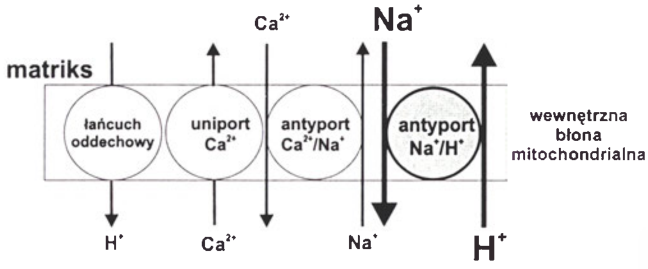
Objętość komórek zwierzęcych jest regulowana przez kontrolowany przepływ jonów do i na zewnątrz komórki. Usuwanie na zewnątrz komórki K^+ i Cl^- zapobiega pęcznieniu, a pobieranie ze środowiska zewnętrznego Na^+ i Cl^- zmniejszaniu się objętości komórki [93]. W przypadku komórek wielu typów za pobieranie jonów Na^+ odpowiedzialne są antyportery Na^+/H^+ [94]. Pod wpływem kurczenia się komórek w środowisku hiperosmotycznym dochodzi do aktywacji białek NHE, napływu jonów Na^+ i ponownego uzyskania przez komórkę poprzedniej objętości, mimo niezmienionych warunków zewnętrznych [94]. Nieznany jest dotąd dokładny mechanizm odpowiedzialny za odbieranie przez komórkę sygnału o zmieniającej się objętości i przekazywanie tej informacji do białek NHE. Wiadomo jedynie, że pod wpływem zmian objętości komórki wrażliwość antyportera na stężenie H^+ wzrasta w pH alkalicznym [95].

IV-1.3. Transport w komórkach nabłonkowych

Aktywność antyporterów Na^+/H^+ jest opisywana dla błon plazmatycznych wszystkich komórek nabłonkowych, gdzie ich rola polega na regulacji transportu jonów Na^+ i H^+ [96]. W kanalikach proksymalnych nerek białko NHE jest niezbędne dla resorpcji jonów HCO_3^-. Antyport Na^+/H^+ poprzez lekkie zakwaszenie światła kanalików nerkowych pośrednio uczestniczy także w transporcie słabych kwasów do komórek (związki te po uprotonowaniu dyfundują przez błonę cytoplazmatyczną). Ostatnio pokazano, że transport jonów H^+ przez białko NHE3 jest istotny dla prawidłowego transportu produktów degradacji białek w jelicie cienkim [97]. Aminokwasy, dipeptydy i niektóre leki są transportowane do wnętrza komórek nabłonka poprzez symport z H^+. Aktywność białka NHE3 zapewnia optymalną absorpcję Na^+ i czynników odżywczych jednocześnie utrzymując fizjologiczne pH_i [97].

IV-2. Antyporter Na+/H+ wewnętrznej błony mitochondrialnej

Elektroobojętne antyportery kation/H^+ grają bardzo istotną rolę w regulacji objętości mitochondriów oraz w utrzymywaniu homeostazy jonów Ca^{2+} wewnątrz komórki. W komórkach ssaków mitochondrialne stężenie Ca^{2+} jest kontrolowane przez współdziałanie trzech mechanizmów transportujących. Należą do nich: uniport Ca^{2+} oraz antyporty Na^+/Ca^{2+} i Na^+/H^+ (białko NHE6) zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Ryc. 3)



Ryc. 3. Transport Ca^{2+} przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Wzrost stężenia jonów wapniowych w cytosolu powoduje ich pobieranie do mitochondriów poprzez uniport wapniowy. Jony Ca^{2+} są następnie usuwane z mitochondriów na wymianę z Na^+ przez antyporter Na^+/Ca^{2+}. Antyporter Na^+/H^+ usuwa Na^+ do cytosolu przywracając jego stężenie do wartości początkowych, kosztem gradientu protonowego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej wytworzonego przez pompy protonowe łańcucha oddechowego.

[48]. Antyporter Na^+/H^+ (białko NHE6) jest prawdopodobnie zawsze aktywny w oddychających mitochondriach i odpowiada za utrzymanie gradientu Na^+ w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, który pozwala na zależny od Na^+ wypływ Ca^{2+}. Stężenie Ca^{2+} w matriks mitochondrialnej wpływa na aktywność takich enzymów, jak dehydrogenazy cyklu kwasów karboksylowych, F_1F_0ATP-aza, translokaza nukleotydów adeninowych [98]. Ponieważ zmiany stężenia Ca^{2+} w cytosolu często towarzyszą zmianom w metabolizmie komórki, przypuszcza się, że jony Ca^{2+} mogą stanowić ogniwo łączące poziom produkcji ATP w mitochondriach ze zmieniającymi się potrzebami energetycznymi komórki [99]. Przyjmuje się, że zmiany stężenia Ca^{2+} w matriks mitochondrialnej odpowiadają wahaniom stężenia tego jonu w cytoplazmie [100, 101]. Taką korelację wykazano mierząc jednocześnie zmiany stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie oraz zmiany aktywności zależnych od Ca^{2+} dehydrogenaz mitochondrialnych (po aktywacji szlaku związanego z kanałami Ca^{2+} aktywowanymi 1,4,5-trisfosforanem inozytolu w retikulum endoplazmatycznym) [102]. Co więcej, pobieranie Ca^{2+} przez mitochondria reguluje stężenie tych jonów w pobliżu receptorów IP_3R zapobiegając nadmiernemu wypływowi Ca^{2+} z magazynów w ER. [103]. Przypuszcza się, że aktywność białka NHE6 jest niezwykle istotna dla regulacji stężenia Ca^{2+} w mitochondriach, gdyż umożliwia ona efektywny wypływ Ca^{2+} i powrót jego stężenia w matriks mitochondrialnej do wartości spoczynkowych.

V. Uwagi końcowe

Powszechność występowania białek Na^+/H^+ oraz różnorodność czynników wpływających na ich aktywność sugeruje, iż grają one bardzo istotną rolę w utrzymaniu homeostazy jonowej komórki. Takich procesów mianowicie jak regulacja wewnątrzkomórkowego pH, transport jonów i metabolitów w komórkach nabłonkowych oraz regulacja objętości komórki. Ich aktywność podlega ścisłej regulacji i zależy od czynników wzrostu, hormonów, warunków osmotycznych. Wciąż jednak wiele bardzo istotnych problemów dotyczących antyporterów Na^+/H^+ pozostaje do rozwiązania. Poznano jedynie niektóre szczegółowe procesy prowadzące do regulacji aktywności tych białek, niewiele wiadomo o aminokwasach zaangażowanych w wiązanie kationów i ich transport, a także o istocie oddziaływania cytosolowej domeny regulatorowej białek NHE z odpowiedzialną za transport jonów domeną hydrofobową.

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Panu dr hab. Adamowi Szewczykowi za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy i pomoc.

Praca została napisana w ramach realizacji projektu badawczego nr 6 P04A 014 18 finansowanego przez KBN.

Artykuł otrzymano 9 marca 2000 r.
Zaakceptowano do druku 27 marca 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Fliegel L, Wang H J (1997) *Mol Cell Cardiol* **29**: 1991-1999
2. Jia ZP, McCullough N, Martel R, Hemmingsen S, Young PG (1992) *EMBO J* **11**: 1631-1640
3. Tse M, Levine S, Yun C, Brant S, Counillon LT, Pouyssegur J, Donowitz M (1993) *J Membr Biol* **135**: 93-108
4. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J (1997) *Physiol Rev* **77**: 51-74
5. Fliegel L, Frohlich O (1993) *Biochem J* **296**: 273-285
6. Ahearn GA, Clay LP (1989) *Am J Physiol* **257**: R484-493
7. Marra MA, Prasad SS, Baillie DL (1993) *Mol Gen Genet* **236**: 289-298
8. Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1480-1485
9. Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y (1999) *Biochim Biophys Acta* **1446**: 149-155
10. Schuldiner S, Padan E (1993) *Int Rev Cytol* **137C**: 229-266
11. Padan E, Schuldiner S (1994) *J Exp Biol* 196: 443-456
12. Orlowski J, Grinstein S (1997) *J Biol Chem* **272**: 22373-22376
13. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J (1989) *Cell* **56**: 271-280
14. Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE (1992) *J Biol Chem* **267**: 9331-9339
15. Wang Z, Orlowski J, Shull GE (1993) *J Biol Chem* **268**: 11925-11928
16. Tse CM, Levine SA, Yun CH, Khurana S, Donowitz M (1994) *Biochemistry* **33**: 12954-12961
17. Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orlowski J, Otterud BE, Leppert M, et al (1995) *Genomics* **25**: 615-622
18. Collins JF, Honda T, Knobel S, Bulus NM, Conary J, DuBois R, Ghishan FK (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3938-3942
19. Numata M, Petrecca K, Lake N, Orlowski J (1998) *J Biol Chem* **273**: 6951-6959
20. Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouyssegur J (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2424-2428
21. Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J (1990) *Science* **247**: 723-726
22. Biemesderfer D, DeGray B, Aronson PS (1998) *J Biol Chem* **273**: 12391-12396.
23. Noel J, Pouyssegur J (1996) *Am J Physiol* **268**: C283-296
24. Chow CW, Woodside M, Demaurex N, Yu FH, Plant P, Rotin D, Grinstein S, Orlowski J (1999) *J Biol Chem* **274**: 10481-10488
25. Counillon L, Pouyssegur J, Reithmeier RA (1994) *Biochemistry* **33**: 10463-10469
26. Nakai K., M. Kanehisa? (1992) *Genomics* **14**: 897-911
27. Fafournoux P, Noel J, Pouyssegur J (1994) *J Biol Chem* **269**: 2589-2596
28. Fliegel L, Haworth RS, Dyck JR (1993) *Biochem J* **289**: 101-107
29. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS (1993) *Am J Physiol* **265**: F736-742
30. Haworth RS, Frohlich O, Fliegel L (1993) *Biochem J* **289**: 637-640
31. Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, Donowitz M (1996) *Am J Physiol* **270**: G29-41
32. Attaphitaya S, Park K, Melvin JE (1999) *J Biol Chem* **274**: 4383-4388
33. Baird NR, Orlowski J, Szabo EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG, Shull GE (1999) *J Biol Chem* **274**: 4377-4382
34. Besson P, Fernandez-Rachubinski F, Yang W, Fliegel L (1998) *Am J Physiol* **274**: C831-839
35. Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orlowski J (1994) *J Biol Chem* **269**: 23544-23552
36. Soleimani M, Singh G, Bizal GL, Gullans SR, McAteer JA (1994) *J Biol Chem* **269**: 27973-27978
37. Bai L, Collins JF, Muller YL, Xu H, Kiela PR, Ghishan FK (1999) *Am J Physiol* **277**: R1112-1119
38. Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y, Niu P, Musch MW, Rao MC, Chang EB (1994) *J Clin Invest* **93**: 106-113
39. Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Villereal M, Rao MC, Chang EB (1994) *J Biol Chem* **269**: 29704-29709
40. Raley-Susman KM, Cragoe EJ Jr, Sapolsky RM, Kopito RR (1991) *J Biol Chem* **266**: 2739-2745
41. Grinstein S, Woodside M, Waddell TK, Downey GP, Orlowski J, Pouyssegur J, Wong DC, Foskett JK (1993) *EMBO J* **12**: 5209-1528
42. Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orlowski J, Grinstein S (1999) *J Biol Chem* **274**: 29843-29849.
43. Van Dyke RW (1995) *Am J Physiol* **269**: C943-954
44. Hensley CB, Bradley ME, Mircheff AK (1990) *Kidney Int* **37**: 707-716
45. D'Souza S, Garcia-Cabado A, Yu F, Teter K, Lukacs G, Skorecki K, Moore HP, Orlowski J, Grinstein S (1998) *J Biol Chem* **273**: 2035-2043
46. Fan L, Wiederkehr MR, Collazo R, Wang H, Crowder LA, Moe OW (1999) *J Biol Chem* **274**: 11289-11295

47. Nass R, Rao R (1998) *J Biol Chem* **273**: 054-060
48. Bernardi P (1999) *Physiol Rev* **79**: 1127-1155
49. Levine SA, Montrose MH, Tse CM, Donowitz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 25527-25535
50. Brierley GP, Davis MH, Cragoe EJ Jr, Jung DW (1989) *Biochemistry* **28**: 4347-4354
51. Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Rabenau K, Villereal M, Rao MC, Chang EB (1996) *Am J Physiol* **271**: C1629-1638
52. Kapus A, Lukacs GL, Cragoe EJ Jr, Ligeti E, Fonyo A (1988) *Biochim Biophys Acta* **944**: 383-390
53. Kapus A, Ligeti E, Fonyo A (1989) *FEBS Lett* **251**: 49-52
54. Yu FH, Shull GE, Orlowski J (1993) *J Biol Chem* **268**: 25536-25541
55. Aronson PS (1983) *Am J Physiol* **245**: F647-659
56. Grinstein S, Goetz JD, Rothstein A (1984) *J Gen Physiol* **84**: 565-584
57. Kleyman TR, Cragoe EJ Jr (1988) *J Membr Biol* 105: 1-
58. Counillon L, Scholz W, Lang HJ, Pouyssegur J (1993) *Mol Pharmacol* **44**: 1041-1045
59. Orlowski J, Kandasamy RA (1996) *J Biol Chem* **271**: 19922-19927
60. Orlowski J (1993) *J Biol Chem* **268**: 16369-16377
61. Ives HE, Yee VJ, Warnock DG (1983) *J Biol Chem* **258**: 9710-9716
62. Sastrasinh M, Young P, Cragoe EJ Jr, Sastrasinh S (1995) *Am J Physiol* **268**: C1227-C1234
63. Counillon L, Noel J, Reithmeier RA, Pouyssegur J (1997) *Biochemistry* **36**: 2951-2959
64. Cassel D, Katz M, Rotman M (1986) *J Biol Chem* **261**: 5460-5466
65. Goss GG, Woodside M, Wakabayashi S, Pouyssegur J Waddell T, Downey GP, Grinstein S (1994) *J Biol Chem* **269**: 8741-8748
66. Paris S, Pouyssegur J (1984) *J Biol Chem* **259**: 10989-10994
67. Moor AN, Fliegel L (1999) *J Biol Chem* **274**: 22985-22992
68. Wang H, Silva NL, Lucchesi PA, Haworth R, Wang K, Michalak M, Pelech S, Fliegel L (1997) *Biochemistry* **36**: 9151-9158
69. Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P (1999) *FEBS Lett* **449**: 61-65
70. Nath SK, Kambadur R, Yun CH, Donowitz M, Tse CM (1999) *Am J Physiol* **276**: C873-882
71. Tse CM, Levine S, Yun C, Brant S, Pouyssegur J, Montrose MH, Donowitz M (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9110-9114
72. Wiederkehr MR, Zhao H, Moe OW (1999) *Am J Physiol* **276**: C1205-17
73. Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M (1994) *J Biol Chem* **269**: 13703-13709
74. Wakabayashi S, Ikeda T, Noel J, Orlowski J, Pouyssegur J, Shigekawa M (1995) *J Biol Chem* **270**: 26460-26465
75. Lin X, Barber DL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12631-12636.
76. Silva NLCL, Haworth RS, Singh D, Fliegel L (1995) *Biochemistry* **34**: 10412-10420
77. Donowitz M, Welsh MJ (1986) *Annu Rev Physiol* **48**, 135-150.
78. Weinmann EJ, Shnolikar S (1993) *Annu Rev Physiol* **55**: 289-304
79. Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, Donowitz M (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3010-3015.
80. Kurashima K, Yu FH, Cabado AG, Szabo EZ, Grinstein S, Orlowski J (1997) *J Biol Chem* **272**: 28672-28679
81. Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A (1998) *J Biol Chem* **273**: 25856-25863
82. Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S, Lefkowitz RJ (1998) *Nature* (Lond) **392**: 626-630
83. Weinman EJ, Sansom SC, Knight TF, Senekjian HO (1982) *J Membr Biol* **69**: 107-111
84. Kahn AM, Dolson GM, Hise MK, Bennett SC, Weinman EJ (1985) *Am J Physiol* **248**: F2-8
85. Maly K, Uberall F, Loferer H, Doppler W, Oberhuber H, Groner B, Grunicke H (1989) *J Biol Chem* **264**: 11839-11842
86. Voyono-Yasenetskaya T, Conklin BR, Gilbert LR, Hooley R, Bourne HR, Barber DL (1994) *J Biol Chem* **269**: 47-4724
87. Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8319-8323
88. Hooley R, Yu CY, Symons M, Barber DL (1996) *J Biol Chem* **271**: 6152-6158
89. Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ JR, Lechene C, Schwartz MA (1990) *J Cell Biol* **110**: 1803-1810
90. Schwarz MA, Lechene C, Ingber DE (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7849-7853
91. Levitsky J, Gurell D, Frishman WH (1998) *J Clin Pharmacol* **38**: 887-897.
92. Xiao XH, Allen DG (1999) *Circ Res* **85**: 723-730
93. Cala PM (1983) *Mol Physiol.* **4**, 33-52
94. Grinstein S, Rotin D, Mason MJ (1989) *Biochim Biophys Acta* **988**: 73-97
95. Grinstein S, Rothstein A (1986) *J Membr Biol* **90**: 1-12
96. Aronson PS, Nee J, Suhm MA (1982) *Nature* (Lond) **299**: 161-163
97. Thwaites DT, Ford D, Glanville M, Simmons NL (1999) *J Clin Invest* **104**: 629-635
98. Hansford RG (1994) *J Bioenerg Biomembr* **26**, 495-508
99. Denton RM, McCormack JG (1985) *Am J Physiol* **249**: E543-554
100. Miyata H, Silverman HS, Sollot SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG (1991) *Am J Physiol* **261**: H1123-1134.
101. Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1994) *J Cell Biol* **126**: 1183-1194
102. Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) *Cell* **82**: 415-424
103. Hajnoczky G, Hager R, Thomas AP (1999) *J Biol Chem* **274**: 14157-14162

Sekwencjonowanie genomu człowieka — dwa projekty badawcze, dwie strategie

Sequencing of human genome — two projects, two strategies

GRACJAN MICHLEWSKI[1], WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK[2]

Spis treści:

Contents:

Wykaz stosowanych skrótów: BAC — (ang. *Bacterial Artificial Chromosome*) — sztuczny chromosom bakteryjny, FISH — (ang. *Fluorescence in situ Hybridisation*) — Hybrydyzacja *in situ* fluorescencyjnie wyznakowanych fragmentów DNA, HGP- (ang. *Human Genome Project*) — Projekt Badawczy — Genom Człowieka, MHC — (ang. *Major Histocompatibility Complex*) — Główny kompleks zgodności tkankowej, NCBI — (ang. *National Center for Biotechnology Information*) — Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej, SNPs (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*) — polimorfizmy pojedynczych nukleotydów, STCs — (ang. *Sequence-Tagged Connectors*) — unikatowe sekwencje łączące, STSs — (ang. *Sequence-Tagged Sites*) — sekwencje unikatowe, YAC — (ang. *Yeast Artificial Chromosome*) — sztuczny chromosom drożdżowy.

I. Wstęp

Odkrycie przez J.D Watsona i F.H.C Cricka podwójnej helisy DNA [1] zapoczątkowało ogromny postęp w biologii molekularnej. Poznanie sposobu działania tego nośnika informacji genetycznej, doprowadziło do przełomu w rozumieniu molekularnych podstaw funkcjonowania organizmów żywych, w tym człowieka. Obecnie jesteśmy świadkami innego wielkiego przełomu. Jest nim bliskie już poznanie sekwencji nukleotydowej całego ludzkiego DNA. Kolejność zasad ustalana jest za pomocą metody enzymatycznego sekwencjonowania, opracowanej przez Sangera, znanej jako sekwencjonowanie „dideoksy" [2].

Artykuł traktuje o dwóch niezależnych projektach badawczych, których podstawowym zadaniem jest zsekwencjonowanie genomu człowieka. Jeden z nich rządowy, niekomercyjny, realizowany przez szereg ośrodków naukowych (rozdział II). Drugi prywatny, z założenia komercyjny, w którego realizację zaangażowała się jedna firma (rozdział III). Celem tego artykułu jest ukazanie różnic w podejściu do uzyskiwania sekwencji, omówienie źródeł informacji, postępu badań jak i celów na najbliższą przyszłość każdego projektu z osobna.

II. Projekt Badawczy — Genom Człowieka (HGP)

Projekt Badawczy Genom Człowieka, początkowo kierowany przez Jamesa Watsona, a od

[1]Student IV r. biotechnologii UAM, [2]prof. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Pracownia Genetyki Nowotworów, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Tabela 1

Ośrodki współpracujące w ramach HGP (G-5 wyróżnione pogrubieniem i kursywą)

Skrót	Nazwa ośrodka badawczego	Adres strony internetowej
AECOM	Albert Einstein College of Medicine	paella.med.yale.edu
BCM	***Baylor College of Medicine***	***www.hgsc.bcm.tmc.edu***
Beijing	Human Genome Center, Institute of Genetics, Chinese Academy of Science	hgc.igtp.ac.cn
CGM	Center for Genetics in Medicine (Perkin Elmer/Washington Univ.)	www.ibc.wustl.edu
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH	www.gbf-braunschweig.de
GS	Genoscope	www.genoscope.org
GTC	Genome Therapeutics Corporation	www.cric.com
IMB	Institute for Molecular Biotechnology, Jena Germany	genome.imb-jena.de
KICMM	Karolinska Institute, Center for Molecular Medicine	www.ki.se/cmm
LAHGC	Lita Annenberg Hazen Genome Center, Cold Spring Harbor	sciclio.cshl.org/genseq/
MPIMG	Max Planck Institute for Molecular Genetics	seq.mpimg-berlin-dahlem.mpg.de
JGI	***Joint Genome Institute, U.S. DOE***	***www.jgi.doe.gov***
JST	Japan Science and Technology Corporation	www-alis.tokyo.jst.go.jp
RIKEN	RIKEN Genome Sciences Center	hgp.gsc.riken.go.jp
SC	***The Sanger Centre***	***www.sanger.ac.uk***
SDSTC	Stanford DNA Sequencing and Technology Development Center	sequence-www.stanford.edu
SHGC	Stanford Human Genome Center	www-shgc.stanford.edu
TIGR	The Institute for Genome Research	www.tigr.org
UUGC	University of Utah Genome Center	www.genome.utah.edu
UOAGTC	University of Oklahoma, Advanced Genome Technology Center	www.genome.ou.edu
UTSW	University of Texas, Southwestern Medical Center	gestec.swmed.edu
UWGC	University of Washington Genome Center	www.genome.washington.edu/UWGC
UWMSC	University of Washington Multimegabase Sequencing Center	chroma.mbt.washington.edu
WIBR	***Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT***	***www.genome.wi.mit.edu***
WUGSC	***Washington University, Genome Sequencing Center***	***genome.wustl.edu/gsc***

1993 przez Francisa Collinsa, wszedł w ostatnich latach XX wieku w końcową fazę zbadania kolejności wszystkich deoksynukleotydów, z około 3 miliardów, które występują w 24 nieprzerwanych łańcuchach sekwencji DNA, jakimi są 22 chromosomy autosomalne i 2 chromosomy płciowe. Projekt ten, opracowany przy współpracy Departamentu Energii (DOE — *Departament of Energy*) i Narodowych Instytutów Zdrowia (NIH — *National Institutes of Health*), zatwierdzony został w 1990 r. przez Kongres USA [3]. Czas jego realizacji przewidziano na 15 lat.

W pierwszych etapach projekt badawczy HGP obejmował m.in. opracowanie map genetycznych i fizycznych ludzkich chromosomów oraz usprawnienie technik sekwencjonowania [4]. Postęp w automatyzacji i obniżaniu kosztów sekwencjonowania pozwolił badaczom, skupionym wokół HGP, stanąć przed realną szansą wcześniejszego odczytania całego genomu człowieka — już w 2003 roku [5]. Nie bez znaczenia była i jest ścisła współpraca licznych ośrodków, zaangażowanych w realizację HGP (Tab. 1). Pięć z nich tzw. G5 (wyróżnione w tabeli 1), to największe ośrodki badania genomów, których zadaniem jest przeprowadzenie większości prac związanych z sekwencjonowaniem ludzkiego DNA. Wśród nich wyróżnić należy Centrum Sangera mieszczące się w Cambridge w Wielkiej Brytanii, w którym określono sekwencję nukleotydową znacznej części ludzkiego chromosomu 22 [6]. Oczekuje się, że ośrodek ten „dostarczy" danych, o sekwencji nukleotydów jednej trzeciej ludzkiego genomu [7].

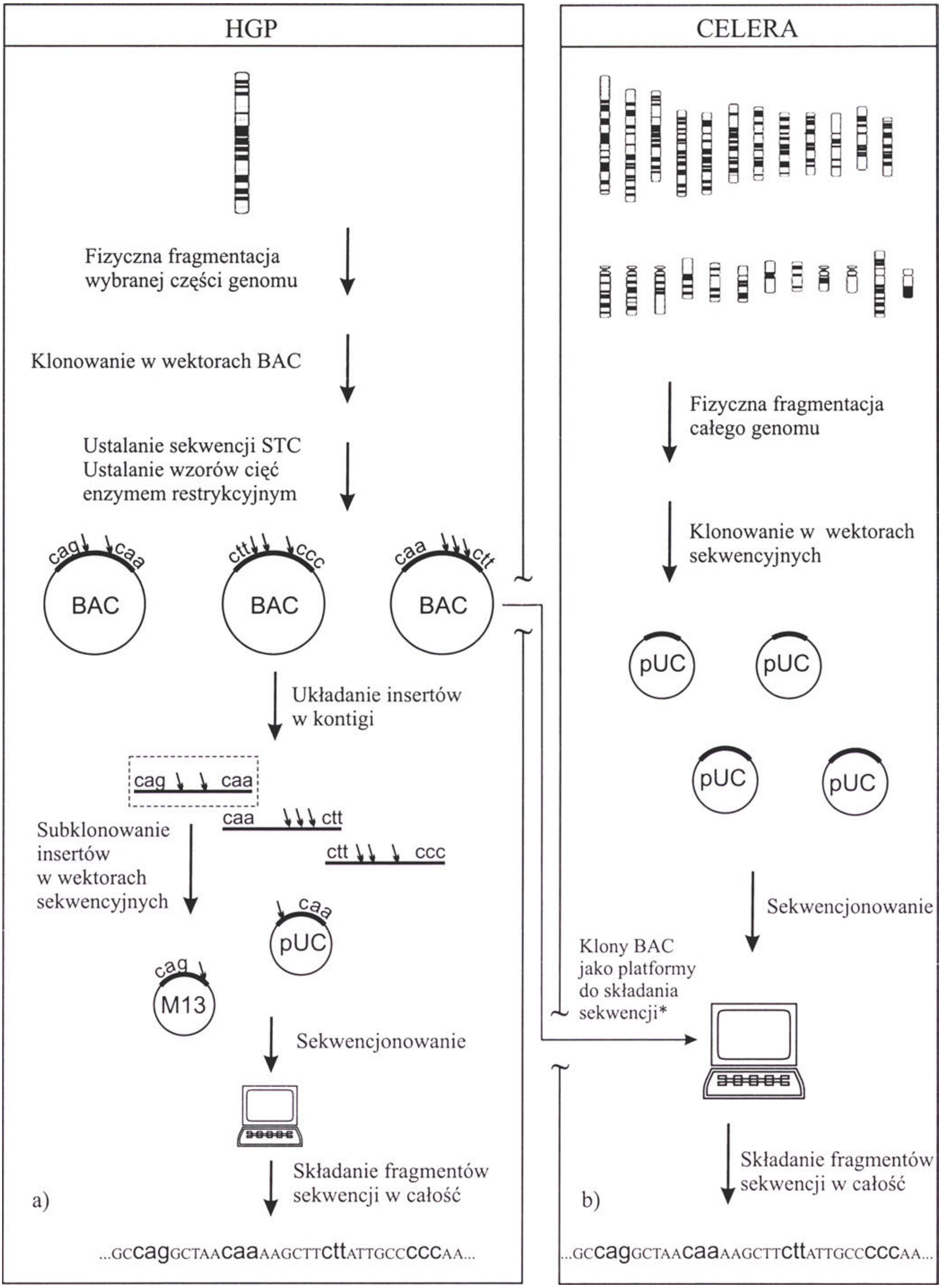
II-1. Strategia sekwencjonowania

Strategią stosowaną przez ośrodki, zaangażowane w HGP jest sekwencjonowanie genomu ludzkiego „klon po klonie" (ang. *clone-by-clone sequencing*). Istotą tego podejścia jest określanie sekwencji częściowo nakładających się na siebie fragmentów DNA, które pochodzą z uszeregowanych klonów (wektor i zawarty w nim insert — fragment DNA) obejmujących konkretny odcinek genomu (np. chromosom lub jego część). Następnie rozpoznane sekwencje łączy się w jeden ciąg, odtwarzający sekwencję badanego odcinka. Ostatecznym etapem będzie rozpoznanie sekwencji badanych fragmentów, które odpowiednio zestawione reprezentować będą cały genom człowieka (Ryc. 1a).

Analizując dokładniej aktualnie realizowane podejście, zwraca uwagę fakt, iż różni się ono dość istotnie od pierwotnie rozważanego. Początkowo, bowiem, zakładano wykorzystanie szczegółowych map fizycznych, powstałych w wyniku określania kolejności nakładających się częściowo klonów typu YAC, w których inserty mogą mieć długość od 100 do 2 000 kpz. W dalszej kolejności inserty miały być subklonowane do kosmidów, których „pojemność" wynosi od 30 do 45 kpz, a ostatecznie do wektorów sekwencyjnych takich jak pUC i M13, mogących pomieścić inserty o optymalnych wielkościach odpowiednio 2 lub 10 kpz i około 1 kpz. Z podejścia tego zrezygnowano, po przedstawieniu innej strategii sekwencjonowania, którą zaproponowali Craig Venter, Hamilton Smith i Leroy Hood [8]. Ideą tego rozwiązania jest wyeliminowanie etapu mapowania fizycznego i wykorzystanie klonów sztucznych chromosomów bakteryjnych BAC, których inserty mają długość 80-350 kpz [8], jako podstawowego źródła fragmentów DNA do sekwencjonowania. Pozwoliło to zwiększyć efektywność sekwencjonowania. Po pierwsze, ponieważ inserty klonów BAC są bardziej stabilne, niż te w klonach YAC i kosmidach [9]. Cechę tę klony BAC zawdzięczają czynnikowi F, zawartemu w ich sekwencji. Czynnik ten, występujący jako odrębny plazmid u *E. coli*, zawiera zestaw genów kodujących białka odpowiedzialne za regulację replikacji, a także za utrzymanie niskiej liczby kopii całego klonu. Po drugie, klony BAC w przeciwieństwie do np. klonów YAC, występują w kolistej superhelikalnej formie. Dzięki temu, są mniej podatne na spontaniczną fragmentację. Istotna przewaga tej nowej strategii nad wyżej opisaną, wynika z faktu, że jednolity zbiór klonów BAC umożliwia sprawną koordynację prac, prowadzonych we wszystkich ośrodkach badawczych biorących udział w HGP.

Etapy uzyskiwania sekwencji w strategii „klon po klonie":

1. Fizyczna fragmentacja wybranej części genomu ludzkiego (np. chromosomu) na odcinki o wielkości około 150 kpz. Najczęściej stosowaną techniką fragmentacji jest nebulizacja [10]. Polega ona na przepychaniu roztworu DNA przez szczelinę stożkowatego cylindra, za pomocą wytworzonego nadciśnienia. Poprzez dobór odpowiedniej szczeliny, można tą metodą uzyskać fragmenty żądanej długości.
2. Losowe wklonowanie uzyskanych fragmentów w wektory sztucznych chromosomów bakteryjnych BAC. Wiązanie insertu z wektorem zachodzi poprzez tępe końce i prowadzone jest po uprzednim ich wyrównaniu przy użyciu fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E.coli* lub polimerazy DNA faga T7 [11].
3. Analiza restrykcyjna poszczególnych klonów BAC w celu sprawdzenia czy nastąpiło związanie wektora z insertem i czy klon nie zawiera kilku różnych fragmentów DNA zamiast jednego, lub też całego innego klonu BAC, jak również w celu dokładnego określenia wielkości insertu.
4. Ustalenie sekwencji nukleotydowej obu końców insertu znajdującego się w konkretnym klonie. Uzyskane w ten sposób sekwencje łączące STC, będące jednym z rodzajów etykietek sekwencji unikatowych STS, pozwalają na ułożenie klonów w kontigi — czyli w ciągi nakładających się częściowo klonów. Do dalszych etapów badań wybiera się te klony bakteryjne, których inserty nakładają się w minimalnym stopniu.
5. Fizyczna fragmentacja insertów i ich subklonowanie w wektorach pUC lub M13, używanych do sekwencjonowania. Przy użyciu metody losowego wyboru klonów, całkowita długość uzyskanej sekwencji musi być kilkukrotnym ekwiwalentem jej wyjściowej długości [10].
6. Doprowadzenie „surowej sekwencji", w której jeden błąd przypada na około 1,000 zasad do sekwencji o wysokiej jakości, której jeden błąd przypada na nie mniej niż 10,000 zasad [12]. Osiąga się to poprzez kilkukrotne powtarzanie sekwencjonowania konkretnego klonu BAC.
7. Uzupełnianie przerw w ciągłości sekwencji, których wielkość i umiejscowienie można wyznaczyć m.in. za pomocą metody FISH, hybrydyzacji *in situ* fluorescencyjnie wyznakowanych fragmentów DNA do rozciągniętych włókien



Ryc. 1. Strategia sekwencjonowania ludzkiego genomu, realizowana przez Projekt Badawczy — Genom Człowieka HGP a), oraz strategia wykorzystywana przez projekt badawczy firmy Celera b). Opis niektórych symboli: pogrubiona linia w klonach — inserty; ↓ — miejsce restrykcyjne; ctt,ccc,caa,cag — symboliczne przedstawienie unikatowych sekwencji łączących STC; ...GCcagGCTAAcaaAAGCTTcttATTGCCcccAA... — symboliczne przedstawienie sekwencji końcowej. *Sekwencje klonów sztucznych chromosomów bakteryjnych BAC pozyskiwane są: z „serwera klonów" HGP, jak również w wyniku własnych prac firmy Celera.

chromatynowych [13]. Następnie DNA obejmujący konkretną przerwę trzeba wklonować do wektorów innych niż BAC np. do kosmidów. Dalsze postępowanie przebiega jak opisano powyżej. Gdy DNA nie jest stabilny w wektorach, a przerwy są krótkie, ich uzupełnianie prowadzi się za pomocą bezpośredniego sekwencjonowania produktów PCR.

Większość badań dotyczących wstępnej analizy klonów BAC (punkty 3 i 4) dla potrzeb wszystkich uczestników projektu wykonują: Centrum Sekwencjonowania Genomu, Uniwersytetu im. Waszyngtona WUGSC (ang. *Washington University, Genome Sequencing Center*) oraz Instytut Badań Genomowych TIGR (ang. *The Institute for Genome Research*) [14]. Przekazywanie informacji i koordynację działań zapewnia „serwer klonów", znajdujący się w bazie danych WUGSC, do którego dostęp możliwy jest przez bazę danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) [15]. Zawiera on mapy klonów BAC (powstałe w wyniku działań opisanych w punkcie 3 i 4). Istotnym etapem koordynacji działań Projektu Badawczego Genom Człowieka jest rozdzielenie konkretnych zadań między poszczególne ośrodki. Na przykład, Centrum Sangera zaangażowane jest w badanie sekwencji chromosomów 1, 6, 9, 10, 13, 20, 22 i X, a Uniwersytet im. Waszyngtona w analizę chromosomów 2, 3, 7, 11, 15, 18, Y [16].

II-2. Postęp w sekwencjonowaniu genomu

Dzięki zastosowaniu przedstawionej strategii i wzmożonemu wysiłkowi wszystkich ośrodków współuczestniczących w HGP, tempo poznawania sekwencji genomu ludzkiego znacznie się zwiększyło. Pod koniec marca 2000 roku łączna długość, zdeponowanych w bazie danych GenBank, sekwencji o wysokiej jakości i „surowej sekwencji" ludzkiego genomu wynosiła odpowiednio 563 606 kpz (17.5%) i 2 104 257 kpz (65.5%), podczas gdy w październiku 1998 długość tej ostatniej wynosiła ok. 180 000 kpz (5,7 %). Śledzenie postępu badań umożliwia bieżące udostępnianie nowo poznanej sekwencji, w Internecie [6]. Tabela 2 przedstawia dane odnośnie sekwencji poszczególnych ludzkich chromosomów z 31 marca 2000 roku [15].

Pierwszy milowy krok w sekwencjonowaniu genomu człowieka zrobili badacze z Centrum Sangera we współpracy z innymi ośrodkami, głównie z Uniwersytetem Oklahoma w USA (UOAGTC) oraz Japońską Korporacją Nauki i Techniki (JST). Było to oznaczenie sekwencji nukleotydowej chromosomu 22 [6]. Jest to drugi najmniejszy, autosomalny, akrocentryczny ludzki chromosom, obejmujący 1,6 — 1,8 % genomowego DNA [17]. Ramię krótsze, oznaczane symbolem p, znajduje się powyżej centromeru, a ramię dłuższe — q, poniżej. Ramię 22p zawiera serię tandemowych powtórzeń, które kodują m. in. rybosomalne RNA. Ponieważ nie było żadnych dowodów na występowanie w ramieniu krótszym genów kodujących białka, cała uwaga badaczy skierowana została na dłuższe ramię 22q. Z pomocą metody „klon po klonie" zsekwencjonowano 33,464 kpz z 34,491 kpz, jakie występują w ramieniu q, z dokładnością jednego błędu na 50 000 zasad. Brakujące 1,037 kpz to 11 przerw w ciągach sekwencji. Wielkość przerw mieści się w granicach 1,9 — 150 kpz. W dalszym etapie badań przerwy te będą uzupełniane. Jak widać nie udało się dotąd rozpoznać całej euchromatyny chromosomu 22. Bez wątpienia jednak, zbadana sekwencja 12 kontigów, obejmująca 33,4

Tabela 2

Sekwencje nukleotydów poszczególnych ludzkich chromosomów, w danych z 31 marca 2000 roku (według NCBI).

Chr.	Efektywna wielkość (kpz)	Poznana sekwencja (%)	Liczba kontigów	Najdłuższy kontig (kpz)
1	263 000	10,8	164	1005
2	255 000	10,1	111	1044
3	214 000	5,7	68	746
4	203 000	6,5	101	359
5	194 000	9,4	114	739
6	183 000	26,7	318	3926
7	171 000	49,5	302	2094
8	155 000	5,8	43	1902
9	145 000	3,8	33	1010
10	144 000	4,8	40	469
11	144 000	6,1	65	817
12	143 000	17,7	104	1526
13	98 000	2,4	8	1416
14	93 000	36,9	116	1581
15	89 000	2,5	17	297
16	98 000	20,9	125	545
17	92 000	31,5	128	1101
18	85 000	4,8	22	349
19	67 000	24,0	147	1008
20	72 000	41,6	145	1187
21	39 000	72,4	51	7223
22	34 491	97,5	12	23051
X	164 000	41,4	340	1024
Y	35 000	22,6	31	1104
Całość	3 180 491	17,7	2614	

Efektywna wielkość chromosomów przedstawia szacowaną całkowitą długość ich sekwencji, pomniejszoną o sekwencje powtarzające się takie jak: występujące w krótkich ramionach akrocentrycznych chromosomów 13, 14, 15, 21 i 22.

Mpz, która przypuszczalnie zawiera 545 genów i 134 pseudogeny, po raz pierwszy dała badaczom możliwość spojrzenia na tak złożony twór, jakim jest ludzki chromosom. Geny obecne w tym chromosomie zawierają się w granicach od 1kpz (np. *HMG1L10*, który koduje S-transferazę tyrozylową) do 583 kpz (genu *LARGE* kodującego aminotransferazę acetylglukozanową). Liczba eksonów w genach, dłuższego ramienia 22q, waha się od 1 do 54, a średnia ich wielkość to 266 pz. Wstępne analizy tej sekwencji, doprowadziły m.in. do zidentyfikowania genów kodujących immunoglobuliny lambda, S-transferazę glutationową, apolipoproteinę.

Do chwili obecnej około 35 chorób kojarzonych jest z mutacjami genów zlokalizowanych w tym chromosomie. Są to choroby m.in. układu odpornościowego, choroby serca, białaczki, jak również choroby układu nerwowego, takie jak ataksja rdzeniowo-móżdżkowa typu 10 [18] i schizofrenia. Biorąc pod uwagę dane uzyskane podczas analizy sekwencji 22q, przewidywana liczba genów w całym ludzkim genomie wynosiłaby 61,000.

Innym ważnym wydarzeniem, związanym z sekwencjonowaniem genomu człowieka, było poznanie kompletnej sekwencji kodującej główny kompleks zgodności tkankowej MHC [19], występującej w krótkim ramieniu chromosomu 6. Jest to sekwencja o długości 3,6 Mpz, zawierająca 244 geny, w większości związane z układem odpornościowym. Gęstość genów MHC jest duża, poznanie zatem całkowitej sekwencji ułatwi proces identyfikacji konkretnych *loci* genowych dla poszczególnych jednostek chorobowych.

13 kwietnia br., na dwa miesiące przed planowanym terminem, ukończony został etap określania sekwencji chromosomów 5, 16 i 19. Dokonali tego badacze z trzech kalifornijskich ośrodków (*Lawrence Berkeley National Laboratory in Berkeley; Lawrence Livermore National Laboratory in Livermore; Los Alamos National Laboratory in Los Alamos*) współpracujących w ramach Połączonego Instytutu Genomowego (JGI — *Joint Genome Institute*), pod auspicjami Departamentu Energii USA [20].

II-3. Źródła informacji

Szybki dostęp do informacji o postępach HGP umożliwia sieć INTERNET. Najczęściej odwiedzanym adresem, który każdemu zainteresowanemu pozwala dotrzeć do danych zgromadzonych m.in. w procesie sekwencjonowania ludzkiego genomu, jest strona NCBI [9]. Ze względu na swą popularność jest ona często opisywana w piśmiennictwie naukowym [21-23]. Innym źródłem godnym polecenia jest strona Centrum Sangera (SC) [7], omawiająca HGP. Pod tym adresem można znaleźć równie wyczerpujące dane dotyczące postępu badań całego genomu, poszczególnych chromosomów, a także opisy stosowanych metod laboratoryjnych oraz narzędzia komputerowe służące do analizy sekwencji jak np. bardzo dobrze opracowany pod względem użytkowym program BLAST, który służy do wyszukiwania podobnych sekwencji w całym genomie lub w wybranych jego częściach. Można tu też odnaleźć pliki danych przedstawiające długie sekwencje DNA.

II-4. Cele HGP na najbliższą przyszłość

Najważniejszym celem Projektu Badawczego — Genom Człowieka do roku 2003 jest poznanie całkowitej sekwencji ludzkiego genomu. Półmetkiem planowanym na czerwiec roku 2000, jest „surowa sekwencja" (ang. *draft sequence*), oznaczona z dokładnością 99.9%, która obejmie 90 procent genomu [24].

Innymi ważnymi celami, których opis nie mieści się w ramach tego artykułu, są:

1. kontynuacja mapowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów SNP, występujących w całym genomie. Te SNP, które znajdują się w sekwencjach genów kodujących białka transportujące i metabolizujące leki, stanowić będą podstawę farmakogenomiki. Nowej dziedziny medycyny, która traktować ma każdego pacjenta indywidualnie, w zależności od posiadanego przez niego zestawu SNP;
2. poznanie wszystkich kompletnych sekwencji cDNA, to jest sekwencji przepisanych z mRNA, a zatem poznanie ludzkiego transkryptomu;
3. sekwencjonowanie genomów organizmów modelowych takich jak mysz [25], czy *Drosophila melanogaster*. Znajomość sekwencji ich genomów, oraz funkcji poznanych w ten sposób genów, pozwoli na lepsze zrozumienie znaczenia homologicznych sekwencji genów u człowieka. Podejmowanie tego ostatniego zadania w obliczu prac prywatnej firmy, o której mowa w kolejnym rozdziale, w niektórych przypadkach (np. *Drosophila melanogaster*) już jest, a w innych może być spóźnione.

III. Projekt badawczy firmy Celera Genomics

9 maja 1998 roku J. Craig Venter firma Perkin-Elmer, i Instytut Badań Genomowych TIGR ogłosili utworzenie nowej firmy [26]. Jej głównym celem

miało być dokonanie w 3 lata, czyli do 2001 roku tego, co Projekt Badawczy — Genom Człowieka HGP przewidywał początkowo na rok 2005 — poznanie sekwencji zasad w ludzkim genomie. Nazwa Celera, bo tak została nazwana firma, pochodzi od angielskiego słowa *celerity*, które w wolnym tłumaczeniu znaczy szybkość. Właśnie szybkość prowadzenia przez tę firmę badań jest jej głównym atutem. Według szefów firmy nowatorskie podejście do sekwencjonowania genomu, opierające się na metodzie *„shotgun"* (objaśnionej w kolejnym rozdziale), jak i 300 w pełni automatycznych sekwenatorów PRISM 3700 firmy Perkin Elmer [27], które połączone są z najpotężniejszym ze stosowanych, cywilnym komputerem, ma przyczynić się do światowej dominacji w przedsięwzięciu badania sekwencji genomów organizmów wyższych, a w szczególności genomu człowieka. Każdy z tych sekwenatorów zawiera 96 kapilar, a wydajność wszystkich 300 szacowana jest na ponad 100 milionów odczytanych zasad dziennie. Komputer, który stworzyła firma Compaq ma gigantyczną moc obliczeniową — 1,3 tryliona operacji na sekundę.

III–1. Strategia sekwencjonowania

Strategia, stosowana przez tę firmę polega na sekwencjonowaniu losowych klonów pokrywających cały ludzki genom (ang. *whole-genome shotgun sequencing*) [28]. Głównym jej założeniem jest sekwencjonowanie ludzkiego DNA jako całości, bez wstępnej selekcji fragmentów, w przeciwieństwie do strategii przyjętej w HGP, w której do analiz wybiera się konkretne odcinki genomu (patrz rozdział II-1). Inną istotną różnicą w stosunku do strategii stosowanej przez HGP jest klonowanie pofragmentowanego DNA bezpośrednio do wektorów sekwencyjnych. (Ryc. 1b)

Tę strategię badawczą, jako alternatywną i tańszą, zaproponowali w 1997 roku Projektowi Badawczemu — Genom Człowieka, James Weber i Eugene Mayers (obecnie zatrudniony w firmie Celera) [28]. Spotkała się ona jednak z ostrą krytyką [29] ze strony badaczy zaangażowanych, w rozwijanie pierwotnie przyjętej strategii sekwencjonowania (rozdział II-1). Sugerowali oni, że z powodu wielu przerw w uzyskanej sekwencji doprowadzenie jej do postaci kompletnej będzie bardzo kosztowne, a całe przedsięwzięcie niezwykle ryzykowne.

Etapy uzyskiwania sekwencji w strategii *„shotgun"*:

1. Fizyczna fragmentacja całego genomowego DNA na krótkie odcinki o długości około 2 kpz, oraz niezależna fragmentacja na odcinki dłuższe około 10 kpz. Autonomiczne pozyskiwanie fragmentów o długości około 150 kpz. (metodę opisano w rozdziale II-1.1.)
2. Wklonowanie fragmentów ~2 kpz i ~10 kpz do wektorów plazmidowych pochodnych pUC, odpowiednio o wysokim i o niskim współczynniku replikacji. Klony z krótszymi insertami stanowią większość matryc do sekwencjonowania, podczas gdy klony z dłuższymi insertami są matrycami obejmującymi m.in. elementy repetytywne np. Line-1. Fragmenty o wielkości około 150 kpz wklonowywane są do wektorów BAC. Fragmenty sekwencji insertów uzyskane z tych klonów, stanowią „platformę", na którą nanoszone są sekwencje insertów uzyskane z klonów pochodnych pUC. Sekwencje końców BAC pozyskiwane są także z „serwera klonów" HGP [15].
3. Sekwencjonowanie odcinków o długości około 500 pz z obu końców insertu, z losowo wybieranych klonów pUC i BAC. Ponieważ sekwencjonowane są tylko końce insertów, a nie całe inserty, całkowita długość uzyskanej sekwencji musi być kilkukrotnym ekwiwalentem jej wyjściowej długości [10].
4. Analiza uzyskanych wyników przy pomocy specjalistycznego oprogramowania, składającego fragmenty sekwencji w całość, zainstalowanego na komputerze Compaq.
5. Identyfikacja i uzupełnianie przerw w uzyskanej sekwencji. W celu identyfikacji przerw wykorzystuje się takie techniki jak: hybrydyzację DNA metodą Southerna lub FISH do rozciągniętych włókien chromatynowych [13]. W celu ich uzupełniania stosuje się BLASTX, czyli komputerowy algorytm, wykorzystujący końcowe sekwencje kontigów w wyszukiwaniu „łączników peptydowych" jak również kroczenie starterami, których sekwencje także pochodzą z końcowych elementów kontigów. Na tym etapie, kłopotliwy dla badacza jest brak uporządkowanych bibliotek klonów, które w strategii sekwencjonowania stosowanej przez HGP stanowią punkt odniesienia (punkt 3 i 4 w rozdziale II-1). Punktem odniesienia dla stosujących metodę *„shotgun"* jest cały genomowy DNA.

III-2. Postęp w sekwencjonowaniu genomu

Wybór przez firmę Celera Genomics kontrowersyjnego podejścia [28, 29] do sekwencjonowania ludzkiego genomu, nie był bezpodstawny. Pierwszym organizmem, którego genom został całkowicie

poznany właśnie tą metodą, była bakteria *Haemophilus influenzae* [30]. Jednak porównanie genomu tego prokarionta — 1,83 Mpz, z genomem człowieka — około 3 miliardami pz jest co najmniej ryzykowne. Fakt ten dla badaczy z firmy J. C. Ventera zdaje się nie stanowić trudności nie do pokonania. We wrześniu 1999 roku, firma Celera ogłosiła, że zakończyła fazę sekwencjonowania genomu *Drosophila melanogaster* — muszki owocowej, organizmu modelowego, posiadającego genom zawierający 180 Mpz [31]. Następnie, wraz z badaczami biorącymi udział w Projekcie Poznania Genomu *Drosophila* z Uniwersytetu Berkeley w Kalifornii został wykonany ostatni etap poznawania sekwencji — składanie jej fragmentów w całość [32]. Zsekwencjonowanie genomu *Drosophila,* poza oczywistymi korzyściami naukowymi, pozwoliło badaczom firmy Celera poznać możliwości posiadanego sprzętu, jak i sprawdzić stosowaną strategię w sekwencjonowaniu dużych genomów. Pomimo, że genom tego organizmu był intensywnie badany na długo przed utworzeniem firmy, Celera zidentyfikowała kilka tysięcy nowych genów, z około 14 tysięcy, jakimi dysponuje *Drosophila.* Po zsekwencjonowaniu takiej liczby fragmentów DNA, że ich łączna długość przekraczała 13-krotnie wielkość genomu i próbie złożenia cząstkowych sekwencji w całość, pozostało nadal 1300 przerw w ciągłości sekwencji. Liczba ta w zestawieniu z 11 przerwami, jakie pozostały w wyniku złożenia fragmentów sekwencji chromosomu 22, daje pogląd na dokładność metody „*shotgun*". Szybkość metody zaważyła jednak na jej wyborze, również przez badaczy związanych z HGP, do sekwencjonowania genomu myszy [33].

Po zakończeniu etapu sekwencjonowania genomu *Drosophila*, w sierpniu 1999 roku firma Celera podjęła badania genomu ludzkiego. Po sześciu miesiącach, 10 stycznia 2000 Celera rozpowszechniła wiadomość, o zsekwencjonowaniu 90 % ludzkiego DNA, co w porównaniu z osiągnięciami HGP było nad wyraz dobrym wynikiem [34]. W rzeczy samej, powyższa informacja nie była do końca prawdziwa, gdyż firma wykorzystała również sekwencje zgromadzone w GenBank, czyli uzyskane m.in. w wyniku prac HGP. Udział tych ostatnich wynosił 9 %. Na podstawie analiz statystycznych jak i porównania ze znanymi genami, Venter sugerował, że 97 procent wszystkich ludzkich genów znajdowało się już w bazie danych jego firmy [35].

6 kwietnia 2000 roku, J.C. Venter ogłosił ukończenie etapu sekwencjonowania genomu pierwszego człowieka, anonimowego mężczyzny, informując jednocześnie o planach sekwencjonowania genomów 4 kolejnych ludzi i o zamiarze złożenia uzyskanych fragmentów sekwencji w sekwencję genomu w okresie 3 do 6 tygodni. Liczba nukleotydów uzyskana podczas sekwencjonowania pierwszego genomu była zaledwie trzykrotnym, a nie jak wcześniej planowano, dla zapewnienia dokładności uzyskanej sekwencji, dziesięciokrotnym ekwiwalentem jego długości. Według badaczy skupionych w HGP, osiągnięty etap można traktować jedynie jako półmetek, który nie przesądza o ostatecznym powodzeniu projektu firmy Celera.

III-3. Źródła informacji

Dostęp do danych prywatnej firmy, jaką jest Celera, zgromadzonych w procesie sekwencjonowania ludzkiego genomu jest na tym etapie badań bardzo utrudniony, ponieważ wartość nowo poznanej sekwencji, jest wyjątkowo wysoka, a Celera ma również konkurentów w postaci innych prywatnych firm, takich jak Incyte, GeneBio. Ponadto wielkie koncerny farmaceutyczne, których założeniem jest czerpanie korzyści z praktycznych zastosowań wiedzy podstawowej, dążą do opracowania nowoczesnych leków, na podstawie znanej sekwencji genów. Według ostatnich doniesień [36], dopiero, gdy cała sekwencja ludzkiego genomu zostanie poznana, będzie ona dostępna na dyskach optycznych, jak i pod internetowym adresem firmy [37]. Roczny dostęp do podstawowych danych będzie kosztować dużą firmę komercyjną około 15 milionów USD, a opłata dla laboratoriów uniwersyteckich ma wynieść od 5 do 15 tysięcy USD. Jest to niepokojąca wiadomość, tym bardziej, że Craig Venter zapewniał wcześniej komisję Kongresu Stanów Zjednoczonych, że wszystkie dane, gromadzone w trakcie sekwencjonowania ludzkiego genomu, deponowane będą co kwartał, w publicznej bazie danych GenBank. Innym faktem jest zadeklarowany przez firmę Celera, zamiar patentowania nowo poznanej sekwencji kilkuset genów, co według wielu badaczy może opóźnić postęp w ich badaniach i potencjalnym wykorzystaniu.

III-4. Firma Celera Genomics w XXI wieku

Głównym celem, jaki postawili sobie badacze z firmy Celera jest zsekwencjonowanie ludzkiego genomu, zanim dokona tego HGP. Faza samego sekwencjonowania, została już ukończona. Do końca roku 2000 sekwencja genomu człowieka ma być dokładnie opisana i opublikowana. Wkrótce po tym, firma planuje poznanie sekwencji genomów kolej-

nych organizmów: myszy, ryżu, czy niektórych mikroorganizmów i odegranie znaczącej roli w badaniach proteomu [38]. Równie istotnym zadaniem, według szefów firmy, jest rozwijanie domeny bioinformatycznej, której narzędzia służące do analizy poznanej już sekwencji przyczynią się do jej lepszego zrozumienia. Bardziej dalekosiężnym celem firmy, jest zdobycie pozycji największego i najpełniejszego źródła informacji, dotyczącej genomiki i biologii molekularnej na Ziemi [37].

IV. Podsumowanie

W artykule tym przedstawione zostały dwa podejścia do sekwencjonowania genomu człowieka. Strategia sekwencjonowania „klon po klonie", którą stosują laboratoria skupione w HGP, oraz strategia sekwencjonowania losowych klonów pokrywających cały ludzki genom, którą wykorzystuje firma Celera. Niezależnie od tego, która z nich okaże się szybsza i skuteczniejsza, osiągnięty cel w postaci całkowitej sekwencji ludzkiego DNA będzie najważniejszym z dotychczasowych osiągnięć w badaniach biologii człowieka. Nawiązując do wypowiedzi F. Collinsa [39], można przypomnieć jego słowa, że właściwie w każdej z chorób człowieka czynnik genetyczny gra swoją rolę. Gdy cała sekwencja ludzkiego genomu będzie poznana, wyszukiwanie i wyjaśnianie korelacji pomiędzy genami, a chorobami ulegnie znacznemu przyspieszeniu.

Należy jednak pamiętać, że nie ma jednej sekwencji genomu, jest ich właściwie ponad 6 miliardów, tyle ile jest ludzi na Ziemi. Z uwagi na to, trwają już intensywne prace zmierzające do poznania różnorodności genomu w obrębie gatunku ludzkiego. Powstało m.in. konsorcjum do badań polimorfizmów pojedynczych nukleotydów SNP, którego celem jest zidentyfikowanie kilkuset tysięcy miejsc polimorficznych, występujących w genomie człowieka[40]. Inną ważną inicjatywą jest realizowany od kilku lat Projekt Poznania Genomu Komórek Nowotworowych (ang. *Cancer Genome Anatomy Project*) [41]. Jego celem jest poznanie, w wyniku kompleksowo prowadzonych badań, wszystkich szlaków mutacyjnych i zmian w ekspresji genów, które warunkują powstawanie nowotworów. Wymienione przykładowe obszary badań genomiki, przeżywają obecnie dynamiczny rozwój. Poznanie całkowitej sekwencji genomu człowieka nada tym badaniom nowy wymiar.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu KBN — 6P04B 031 18

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 2000 r.
Zaakceptowano do druku 17 kwietnia 2000 r.

Piśmiennictwo

1. Watson JD, Crick FHC (1953) *Nature* **171**: 737
2. Sanger F (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
3. *US Dept. of Health and Human Services, US Dept. of Energy* (1990) Gov Print Office 1590
4. Czarny J, Jasińska A, Kozłowski P, Napierała M, Sobczak K, Woźniak M (1997) W: Krzyżosiak W (red) *Genom Człowieka — największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej*, PWN, Warszawa.
5. Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L (1998) *Science* 282: 682-689
6. Dunham I, Shimizn N, Roe BA i wsp. (1999) *Nature* **402**: 489-495
7. http://www.sanger.ac.uk/HGP/overview.shtml
8. Venter JC, Smith HO, Hood L (1996) *Nature* **381**: 364-366
9. Shizuya H, Birren B, Kim U, Mancino V, Slepak T, Tachiri Y, Simon M (1992) *Proc Natl Acad Sci* **89**: 8794-8797
10. Bodenteich A i wsp. (1994) W: Adams MD, Fields Ch, Venter JC (red) *Automated DNA sequencing and analysis.* Academic Press, USA San Diego, str. 42-50
11. http://www.genome.ou.edu
12. Roach JC, Siegl AF, Engh G, Trask B, Hood L (1999) *Nature* **401**: 843-845
13. Sjoberg A, Peelman LJ, Chowdhary BP (1997) *Chromosome Res* **5**: 247-253
14. Zhao S (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 129-132
15. http://www.ncbi.nlm.nih.gov
16. Marshal E (1999) *Science* **284**: 1439-41
17. Morton NE (1991) *Proc Nat Acad Sci USA* **88**: 7474-7476
18. Zu L, Figueroa KP, Grewal R, Pulst SM (1999) *Am J Hum Gen* **64**: 594-599
19. The MHC Sequencing Consortium (1999) *Nature* **401**: 921-923
20. *Human Genome Project (2000)* Press Release 13 kwiecień, http://www.ornl.gov/hgmis/project/51619jgi.html
21. Wheeler DL, Chappey C, Lash AE, Leipe DD, Madden TL, Schuler GD, Tatusova TA, Rapp BA (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 10-14
22. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 15-18
23. Ouellette F (1999) *Clin Genet* **56**: 179-185
24. http://www.nhgri.nih.gov:80/NEWS/collins_approp.html
25. Pennisi E (2000) *Science* **267**: 1178-1181
26. Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M (1998) *Science* **280**: 1541-1542
27. Mullikin JC, Mc Murray AA (1999) *Science* **283**: 1867-1868
28. Weber JL, Mayers EW (1997) *Genome Res* **7**: 401-409
29. Green P (1997) *Genome Res* 7: 410-417
30. Fleishmaun R, Adams MD, White O i wsp. (1995) *Science* **296**: 496-511
31. Pennisi E (2000) *Science* **287**: 2182-2184
32. Adams MD, Celniker SE, Holt RA i wsp. (2000) *Science* **287**: 2185 — 2195 (i inne artykuły w tym numerze Science)
33. Pennisi E (2000) *Science* **287**: 1179-1180
34. *Celera Genomics* (2000) PE Press Releases
35. Smaglik P, Butler D (2000) *Nature* **403**: 119
36. Butler D, Smaglik P (2000) *Nature* **403**: 231
37. http://www.celera.com
38. *Service RF* (2000) Science 287: 2136-2138
39. http://www.nhgri.nih.gov/NEWS/Freegenes/index.html
40. Masood E (1999) *Nature* **398**: 545-546
41. Strasburger RL, Buetow KH, Emmert-Buck MR, Klausner RD (2000) *TIG* **16**: 103-105

Prenumerata P O S T Ę P Ó W B I O C H E M I I rok 2000

dla nie zrzeszonych w PTBioch	40,00 zł
dla członków PTBioch	20,00 zł
dla zakładów i bibliotek	70,00 zł

Składka P.T.Bioch.

za rok 2000	30,00 zł
studenci	10,00 zł